

## 22. インフルエンザウイルス研究センター

センター長 田代 真人

### 概要

当センターは、インフルエンザに関する研究・開発業務及び国の新型インフルエンザ事前準備と緊急対応体制の強化、及びワクチン製剤の品質管理体制の独立を目的として、平成21年4月1日に、6室構成、定員27名で村山庁舎に新設された。業務はインフルエンザの病原・病因・予防・診断・治療法等に関する研究、レファレンス業務、細胞培養ワクチン及び経鼻接種方法の開発、ワクチン製剤の品質管理及び国際協力である。第1室(ウイルスサーベイランス)、第2室(診断検査、国内外研修)、第3室(ワクチン製剤品質管理、GMP管理)、第4室(季節性・新型ワクチン製造株の開発)、第5室(細胞培養ワクチン開発)、第6室(経鼻接種ワクチン開発)が業務を分担・協力しながら実施している。

人事異動では、平成25年4月1日付で白倉雅之、相内章が主任研究官に昇任し、藤崎誠一郎が任期付研究員から研究員に採用された。平成25年4月18日付で中内美名主任研究官が育児休業から職務復帰、平成25年5月1日付で武藤亜紀子が臨時採用、平成25年6月1日付で内藤忠相が任期付研究員として採用された。平成25年8月20日から浜本いつきが育児休業に入り、平成25年9月30日付で今井正樹主任研究官が退職、一方、平成25年10月1日付で鈴木康司が任期付研究員として採用された。平成26年2月28日付で徐紅主任研究官が退職、平成26年3月31日付で田代真人センター長が定年退職、武藤亜紀子が退職した。

平成25年3月31日に鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスがヒトに感染し死亡例が発生した事実が中国当局から公式発表された。その後、中国ではヒト感染例が散発的ではあるが増加傾向にあり致死率が30%を示すことが相次いで発表されたことを受け、センターでは本邦へのA(H7N9)ウイルスの侵入と流行に備えて、インフルエンザウイルス遺伝子国際データベースから遺伝子情報を入手し、直ちに本ウイルスのPCR検出検査系の構築と検査

マニュアルの改訂および全国地衛研へのプライマー・プローブ配備に向けた準備を進めた。同時に、ウイルス遺伝子情報を基にしたリスク評価を実施した。その結果、本ウイルスは鳥に対しては低病原性の性質をもつが、ヒト型レセプターにも結合し易い性質とヒトの上気道温度での増殖性を支持するそれぞれの特徴的な遺伝子変異を獲得していることを明らかにし、鳥インフルエンザA(H5N1)ウイルスよりはパンデミックリスクの高いウイルスであることを中国当局に情報提供するとともに、世界に先駆けて情報公開した。世界保健機関(WHO)は、この情報を基にA(H7N9)ウイルスのリスク評価ガイドラインを発表し、WHOインフルエンザ協力センターを兼務する当センターからの迅速な情報発信は世界から高く評価された。一方、4月中旬にはA(H7N9)ヒト分離株が中国のWHOインフルエンザ協力センターから分与されたことから、事前準備を進めていたPCR検出検査系の感度評価を実施し、全地衛研への実戦配備を4月下旬までに完了させた。並行してワクチン製造用ウイルスの開発をセンターのGMP準拠ワクチン株製造施設で行い、フェレットへの感染実験による安全性確認試験を経て国内外のワクチン製造所へ無償配布した。また、東大医科研、北大獣医学部、動物衛生研究所等14研究機関と共同で各種動物への感染実験によるウイルスリスク評価を実施し、5月中旬までにはパンデミックリスク評価に必要な全ての性状解析を完了させ、直ちに中国当局やWHOへ情報提供した。これらの情報は論文として7月に公表された。

流行動向調査(サーベイランス)事業は例年どおり地衛研、感染症疫学センター、海外機関と協力して進めた。流行ウイルスの抗原・遺伝子解析、流行予測、薬剤耐性モニターを継続し、WHO及び厚労省の依頼に応じて季節性及びH5N1プレパンデミックワクチン製造株を開発・選定・供給した。また、サーベイランスとワクチン製造に必要な抗原解析及び品質管理用の各種標準品の製造・配布及び技術支援を行った。また、本年度はインフ

ルエンザ PCR 検査の外部精度管理試験を全国地衛研に実施し、検査精度の見直しと改善への助言を行った。

ワクチン品質管理業務では、ワクチン国家検定と各標準品に関するレファランス業務を担当し、生物学的製剤 GMP への協力、標準品の開発整備、GMP 中心の国際的品質管理体制の確立に努め、ワクチン製剤の安全性と有効性の確保という NCL の責任を果たした。

国際協力では、新たな WHO パンデミックインフルエンザ基本構想 (PIP-Framework) に基づく世界インフルエンザ監視対応体制 (GISRS) の基幹である WHO インフルエンザ協力センターとして、サーベイランス活動及びパンデミック緊急対応計画の再検討・改善・強化への助言・提言とその実施を担った。世界各国の分離株・臨床検体の解析、流行予測及び候補ワクチンの効果予測から、南北半球向けの WHO ワクチン推奨株を選定した。WHO 世界インフルエンザ行動計画に参画し、PCR 診断、薬剤耐性の各作業班、世界インフルエンザ研究計画の推進、臨床対応指針改訂、ワクチン株選定改良、ワクチン品質管理、細胞培養ワクチン開発などで重要な役割を果たし、また WHO、JICA 等の依頼に応じて、海外への技術指導、研修を行った。WHO H5N1 指定研究室として、世界各地の高病原性 H5N1 の診断、分離、性状解析、技術支援を実施した。また、WHO Essential Regulatory Laboratory として、ワクチン製造候補株の開発及び参照品の作製、国際標準化、分与及び周辺諸国への技術研修と精度管理試験等を実施した。

国の新型インフルエンザ計画としては、半年以内により有効なワクチンを国民全員に供給できる体制構築として、細胞培養 H5N1 ワクチンの実用化を当初の予定通り平成 25 年度末までに完了した。また細胞培養ワクチンに季節性インフルエンザワクチンを導入するために、製造用シードウイルスの作製法、安定供給戦略の企画、品質確保のための試験法の確立を進めた。さらに次世代ワクチンである経鼻粘膜ワクチンの実用化へ向けた小規模臨床試験に国内メーカーと協力して着手した。

国の新型インフルエンザ体制の基本対応として制定された新型インフルエンザ等対策特別措置法、同政令の実施運用に向けての作業に協力した。

## 業 績

### 調査・研究

#### I. インフルエンザウイルスに関する研究

##### 1. 中国で発生した鳥インフルエンザウイルス A(H7N9) 亜型についての遺伝子解析

2013 年 2 月に中国で発生した A(H7N9) ウイルスについて、公開された遺伝子塩基配列情報を用いて、病原性、ヒトへの感染リスク、抗インフルエンザ薬感受性等に関する解析を行った。その結果、トリに対して低病原性であること、ヒトに対して感染および増殖する能力を獲得している可能性が示された。また、国内で使用されている 4 種類の NA 阻害薬に対しては感受性を保持していることを示した。[藤崎誠一郎、影山努、高下恵美、徐紅、山田晋弥\*、内田裕子\*\*、Gabriele Neumann\*\*\*、西藤岳彦\*\*、河岡義裕\*、田代真人：\*東京大学医科学研究所、\*\*農研機構動物衛生研究所、\*\*\*ウイスコンシン大学]

##### 2. 中国で出現した A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析

2013 年に中国で発生した A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの感染者の多くは鳥と接触していたことから、家禽や野鳥がヒトへの感染源として疑われており、実際に生鳥市場の家禽などからもウイルスが分離されている。このウイルスは、高病原性鳥ウイルスの特徴である連続した塩基性アミノ酸配列を HA 蛋白質の開裂部位に欠いていることから、家禽に対する病原性は低いと考えられるが、その詳細は分かっていない。本研究では、A(H7N9)ウイルスの家禽に対する病原性を明らかにする目的で、A(H7N9)ウイルスをニワトリに接種し、各臓器におけるウイルス量を測定した。中国でヒトから分離された A(H7N9)ウイルスと日本でカモから分離された A(H7N9)ウイルスをニワトリ 6 羽に経鼻接種し、気管と総排泄腔におけるウイルス量を測定した。また感染 3 日目と 6 日目に主要臓器を採取した。ウイルス感染価は、MDCK 細胞を用いたブラック法により測定された。ヒト分離株を接種したニワトリでは、いずれの個体も 6 日間の観察期間中に明瞭な臨床症状を示さなかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からは全ての個体でウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。カモ分離株を接種した

ニワトリも同様に臨床症状を示さず、限定された臓器からしかウイルスが検出されなかった。以上の成績は、両ウイルスが家禽に対して低病原性であることを示しており、これらウイルスの HA がその開裂部位に塩基性アミノ酸の連続配列を欠いていることと一致している。家禽は A(H7N9)ウイルスに感染しても症状を示さないことから、感染家禽の摘発が困難になるため、家禽と接触する機会の多い中国ではヒトがウイルスに暴露される機会が継続的に発生していた可能性が考えられる。[岸田典子、今井正樹、白倉雅之、小田切孝人、田代真人]

### 3. ヒト気管上皮細胞における A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの増殖に関する研究

哺乳類における A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの増殖能を調べるために、哺乳動物培養細胞を用いて感染実験を行った。ヒトあるいは鳥から分離された A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスを分化させたヒト気管上皮細胞に接種した後、ヒト上気道の温度である 33°C で培養した。経時的に培養上清を採取し、上清中のウイルス量をブラック法により測定した。その結果、ヒトから分離された A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスは 2009 年の A(H1N1)パンデミックウイルスと同程度の効率で増えることが分かった。一方、鳥から分離された A(H7N9)ウイルスは 2009 年の A(H1N1)パンデミックウイルスに比べて増殖速度が有意に低かった。[今井正樹、小田切孝人、田代真人]

### 4. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの抗インフルエンザ薬感受性に関する研究

中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)は、依然としてヒトへの感染例が報告されており、日本国内においても流行に備えた事前準備が必要である。そこで、日本国内で使用されている抗インフルエンザ薬について、A(H7N9)ウイルスの感受性を調べた。その結果、中国でヒトから分離された A(H7N9)ウイルスは、4 種類の NA 阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）すべてに対して感受性を示し、治療効果が期待されることが明らかになった。一方で、すべての NA 阻害剤に対して感受性の低下を示す A(H7N9)ウイルスも検出され、耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握するた

めに、継続的に耐性ウイルスの監視を行う必要性が示唆された。また、耐性ウイルスの監視に際しては、表現型解析と遺伝子型解析の両方を並行して実施することで、耐性ウイルスを見逃す危険性を回避できることが示された。[高下恵美、徐紅、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

### 5. 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行に関する研究

インフルエンザ A(H1N1)pdm09 の予防および治療には抗インフルエンザ薬の NA 阻害剤が用いられる。NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつ NA 阻害剤耐性ウイルスは国内外で散発的に検出されており、我々は全国地方衛生研究所と共同で、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施し、継続的に耐性ウイルスの監視を行っている。札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制を強化し、2014 年 3 月末までに全国で解析された 1,548 株のうち 78 株が耐性株で、検出率は 5% に達することが明らかになった。現在のところ、耐性ウイルスの検出は札幌市を中心とした地域流行にとどまっているが、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。国内における耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供するために、耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。[高下恵美、江島美穂、伊東玲子、三浦舞、藤崎誠一郎、中村一哉、土井輝子、佐藤彩、菅原裕美、小田切孝人、田代真人]

### 6. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス実験室診断系の構築および全国の地方衛生研究所・検疫所における A(H7N9)ウイルス診断検査体制の整備

2013 年 3 月に、世界で初めてとなる H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルス A(H7N9)ウイルスのヒトへの感染例が中国で報告された。その後もヒト感染例が相次いで報告され、このウイルスを起源としたパンデミックの発生が危惧されるようになった。この A(H7N9)ウイルスの H7 遺伝子は、これまでヒト感染例が報告された H7N3 および H7N7 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス

とは系統が大きく異なり、今回このウイルスが日本に侵入してヒト感染が起きた場合に備え、コンベンショナル RT-PCR 法および TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により、中国で流行している A(H7N9)ウイルスを特異的に検出できる遺伝子診断系の構築を行った。構築した遺伝子診断系は、季節性インフルエンザウイルスの A(H1N1)pdm09、A(H3N2)や B 型インフルエンザウイルスとは交差せず、また、A(H5N1)ウイルスなど、他の亜型の鳥インフルエンザウイルスとは交差反応せず、中国で流行している A(H7N9)ウイルスのみを高感度に検出する事が可能であった。

また、全国の 74 カ所の地方衛生研究所および全国の 16 カ所の検疫所に対して、本検出系で使用するプライマー、プローブ、RT-PCR 検出用陽性コントロールおよび診断マニュアルを配布し、全国の地方衛生研究所・検疫所における A(H7N9)ウイルス診断検査体制の整備を行った。なお、本検出系を用いた A(H7N9)ウイルス検査法は、感染研ホームページに公開した。[高山郁代、高橋仁、中内美名、田代真人、影山努]

#### 7. RT-LAMP 法を用いた A(H7N9)ウイルス遺伝子検出系の構築

RT-LAMP(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)法を用いた A(H7N9)ウイルス遺伝子検出法を構築した。本検出系を用いた A(H7N9)ウイルス検査法について、全国 74 カ所の地方衛生研究所および全国 16 カ所の検疫所へ情報提供するとともに、本検出系を実施する可能性があり配布希望のあった各機関に対して、RT-LAMP 検出用陽性コントロールの配布を行った。[中内美名、高山郁代、高橋仁、田代真人、影山努]

#### 8. 国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットの A(H7N9)ウイルスに対する反応性についての検討

臨床現場では、インフルエンザの診断のための検査としてインフルエンザウイルスの NP 抗原を検出する迅速診断キットが多用されている。体外診断薬として国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットのうち 20 種類を対象として、A(H7N9)ウイルスに対する反応性について確認を行った。その結果、国内で市販されている 20 種類のインフルエンザ迅速診断キットは A(H7N9)

ウイルスに反応する事が示された。詳細結果については感染研のホームページで公開した。[高山郁代、高橋仁、中内美名、田代真人、影山努]

#### 9. 喀痰検体を用いた A(H7N9)ウイルスの遺伝子診断法およびウイルス分離法の確立

中国および輸入感染例としてウイルスが検出された台湾では、A(H7N9)ウイルスが咽頭拭い液などの上気道では検出できずに喀痰検体などの下気道のみでしか検出できない事例が相次いだ。そこで、喀痰検体でも、簡便かつ効率的に A(H7N9)ウイルスの遺伝子診断およびウイルス分離を行えるように、各種の喀痰溶解法について検討を行い、これらの目的に合致した喀痰検体の前処理法を確立した。[中内美名、高山郁代、高橋仁、影山努]

#### 10. 識別マーカー入り A(H7N9)ウイルス遺伝子診断用陽性コントロールの作製および配布

RT-PCR 法などの遺伝子増幅法は高感度な故、陽性コントロールがコンタミネーションにより検査系へ混入すれば偽陽性の結果を導く事となりその取り扱いには細心の注意が必要である。万が一、検査系に陽性コントロールがコンタミネーションしても、陽性コントロール由来である事が確認できれば、このような問題も解消する。そこで、陽性コントロール由来かどうかを識別できるマーカー入りの A(H7N9)ウイルス遺伝子診断用陽性コントロールを作製して、全国の 74 カ所の地方衛生研究所に配布した。[高橋仁、高山郁代、中内美名、影山努]

#### 11. リアルタイム RT-PCR 法を用いた B 型インフルエンザウイルスのヴィクトリア系統・山形系統識別遺伝子診断系の構築

B 型インフルエンザウイルスは 80 年代後半より抗原的にも遺伝的にも異なる B/Victoria/2/87-like (ヴィクトリア系統)と B/Yamagata/16/88-like (山形系統)の 2 系統が存在するようになり、シーズンにより流行規模は変動するが、現在も両系統が流行している。従来、検体より分離したウイルスに対して、両系統の抗血清を用いた赤血球凝集抑制試験 (HI 試験法) による系統識別が広く行われていた。そこで、ウイルス分離を行わなくとも、検体レベルでより迅速に両系統を識別して流行状況を把握する

事ができるように、TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により両系統を簡便に識別できる遺伝子診断系を新たに構築した。

[中内美名、高山郁代、高橋仁、田代真人、影山努]

## 12. インフルエンザウイルス核酸診断検査法の地方衛生研究所に対する外部精度管理の実施

全国 74 ヶ所の地方衛生研究所に対して、インフルエンザウイルス核酸診断検査法(リアルタイム RT-PCR 法)についての第 1 回全国地衛研外部精度管理(EQA)を実施した。各地方衛生研究所から送付された結果報告およびアンケートに対して詳細な解析を行い、EQA の結果については各所に報告した。また、EQA を実施した結果、各所が行うインフルエンザウイルス核酸診断検査法に何らかの問題点が見つかった場合はトラブルシューティングを個別に行い、検査精度向上に向けた改善方法などを助言した。[影山努、中内美名、高山郁代、高橋仁]

## 13. 呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築

インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系を構築し、感染症診断に応用することを目的とした研究を行っている。本年度は新たなウイルス検出候補としてヒトパラインフルエンザウイルス 3 型を選択し、RT-LAMP 法による検出系の構築を行った。また、昨年度評価を行った中で検出感度の低かったヒトコロナウイルスの HKU1、229E の 2 種類について、高感度に各ウイルスの遺伝子を検出できるように RT-LAMP 法による検出系の改良を行った。これまでに、設計したプライマーセットを用いた RT-LAMP 法による検出系は呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系として有用であることが示唆された。[高橋仁、高山郁代、中内美名、永田志保、改田厚\*、久保英幸\*、田代真人、影山努：\*大阪市立環境科学研究所]

## 14. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討

抗原抗体反応法による感度と特異性に優れた H5N1 インフルエンザの迅速診断法構築に応用するため、H5 HA 特異的なモノクローナル抗体を作製して、作製した抗体クローンをを用いたサンドイッチ ELISA 法への応用につ

いて検討を行った。また、同時にこの抗体が効率良く抗原と反応する界面活性剤処理条件を見出した。その結果、新たに構築したサンドイッチ ELISA 法の検出感度は  $0.3 \mu\text{g/mL}$  となり、これまでに報告されている 抗原抗体反応法による H5 検出系と比較しても遜色ない感度であった。亜型特異性については H5 亜型ウイルスを除く H1 から H15 亜型ウイルスについては交差反応性を示さなかった。また、H5 亜型ウイルスの中では主要なクレード株に対しても反応性を示したことから、現在流行している H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを高感度・特異的に検出することが可能と考えられた。[高橋仁、高山郁代、中内美名、永田志保、大西和夫\*、小林美栄\*、横田(恒次)恭子\*、田代真人、影山努：\*免疫部]

## 15. シクロスポリン A(CsA)によるインフルエンザウイルス増殖阻害に関する研究

インフルエンザ治療薬として M2 阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤が使用されているが、薬剤耐性ウイルスの出現による治療効果の減弱が問題となっている。そのため、薬剤耐性ウイルスにも効果を示す新規インフルエンザ治療薬を開発する必要がある。今回、CsA によるインフルエンザウイルス(PR8 株)の増殖抑制機序について解析した。CsA 存在下で PR8 株を感染した結果、シクロフィリン A、シクロフィリン B 及び P 糖蛋白質に非依存的に感染後期(集合、出芽、放出)を阻害し、ウイルスの増殖が抑制されることが示唆された。[浜本いつき、原崎一浩\*、稲瀬直彦\*、高久洋\*\*、田代真人、山本典生：\*東京医科歯科大学呼吸器内科、\*\*千葉工大工学部生命環境科学科]

## 16. 中国で発生したインフルエンザ H7N9 株の動物における感染性の検討

2013 年より中国で発生した新規インフルエンザ H7N9 株の動物における感染性および病原性を検討している。A/Anhui/1/2013 (H7N9) 株のマウスにおける致死性を検討した結果、50%致死量は  $10^{4.6}$  pfu/mouse であり、H1N1pdm の A/Narita 株 ( $10^{5.2}$  pfu/mouse) よりも高い致死性を有することが明らかとなった。続いてウイルスの気道における感染の動態や神経向性を検討するため、高濃度のウイルスを局所経鼻感染 ( $40\text{LD}_{50}$ ,  $4 \mu\text{L}$ )

させた後のウイルスの動態を検討した。その結果、上気道では感染直後から高いウイルス価を示したが、感染 5 日目以降、経時的に減少し、14 日後に消失した。下気道では感染 3 日目からウイルスの増殖が認められ 5 日目をピークに経時的に減少した。この結果は実験室株である PR8 と同様の増殖カーブであり、感染は呼吸器に限定していることを示唆している。また病理像においても脳内におけるウイルスの増殖は認められないことならびに感染時に神経症状は認められなかったことから、本株には神経向性が認められないことも明らかとなった。[浅沼秀樹、相内 章]

## II. インフルエンザワクチンに関する研究

### 1. インフルエンザワクチンの血清学的評価に関する研究

ワクチン接種により得られるヒト血清抗体の流行株との交叉反応性を調べることは、インフルエンザワクチンの有効性やワクチン株の変更の必要性を検討するうえで重要である。そこで、成人層および老人層の各群 30 名からワクチン接種前後のペア血清検体を収集し、流行株に対する交叉反応性を赤血球凝集抑制試験にて評価した。アメリカ、イギリスから入手したヒト血清についても同様の評価を行った。その成績は WHO インフルエンザ協力センター間で共有され、9 月と 2 月に開催された WHO インフルエンザワクチン推奨株選定会議で議論され、ワクチン株選定の資料として活用された。[岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、菖蒲川由郷\*、齋藤玲子\*、田代真人、小田切孝人：\*新潟大学国際感染医学講座]

### 2. 4 価インフルエンザワクチンの SRD 力価試験における B 型の交叉反応性に関する研究

現行のインフルエンザ HA ワクチンは、3 価 (A/H1N1、A/H3N2、B) のワクチンである。B 型ウイルスは抗原性の違いからビクトリア系統と山形系統に分類されるが、これまでどちらかの系統をワクチン株として制定してきた。しかし近年、国内外ともにビクトリア系統と山形系統のウイルスが混合流行しており、来シーズンにどちらの系統のウイルスが流行するかを予想することは極めて

困難になってきている。米国では 2012 年から 2013 年に両系統のウイルスを含んだ 4 価ワクチンの製造販売が承認され、わが国においても 4 価ワクチンの導入が検討され始めた。本研究では、ワクチン力価測定の方法である一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法が、4 価ワクチンに対しても、従来通り測定可能であることを検証した。その結果、ワクチン株および SRD 試験抗血清によっては、B 型 2 系統の交叉反応が大きく見られ、4 価ワクチンの B 型 SRD 力価が過剰測定される現象が認められた。これを解消すべく、ビクトリア系統と山形系統の標準抗原を混合する方法を検討したところ、ワクチン株および標準抗原によっては、3 価従来法と統計学的に有意差が認められ、乖離が解消できないケースもあった。また、ビクトリア系統抗原と山形系統抗原を混ぜた時にリング形成不良を起こすケースも見られ、種々の課題があることが判明した。[嶋崎典子、原田勇一、高橋仁、板村繁之、田代真人]

### 3. ワクチンの免疫誘導能に関連する試験法の開発に関する研究

現在、わが国ではワクチンの力価を測定する標準法として、一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法によりワクチンの有効成分の HA 含量を測定しているが、剤型の違いを区別しそれに基づく免疫誘導能を測定できる試験法ではない。パンデミック発生時には迅速なワクチン製造が必要であり、ワクチンの免疫原性を反映するような力価を測定できる SRD 試験の代替試験法が望まれている。本研究ではまず、SRD 試験の代替法の 1 つとして昔から検討されてきた逆相 HPLC により、ワクチンの剤型の違いを示すような現象が見られるかを調べた。その結果、SRD 試験で同じ力価を示すスプリットワクチンとサブユニットワクチン (精製 HA 蛋白で模擬) について、Zwittergent3-14 処理をしない状態で逆相 HPLC 測定をしたところ、2 つの異なる剤型のワクチンのクロマトグラムは大きく異なり、剤型の違いの区別がつけられる方法の 1 つである可能性が示唆された。

[嶋崎典子、板村繁之、田代真人]

### 4. インフルエンザワクチンの剤型による免疫応答の違いに関する研究

インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの性状・形状の管理はワクチンの効果と副反応に関連する生体応答を制御する上で重要と考えられる。これまでに全粒子ワクチンとスプリットワクチンでは産生誘導される抗体の質が異なることを報告した。本年度、この誘導される抗体の産生機構の解明を目指し、TLR アゴニストをアジュバントとしてスプリットワクチンに添加したところ、全粒子ワクチンを接種した場合に誘導される抗体と質的に類似した抗体が誘導され、TLR を介したシグナルが関与していることが示唆された。[佐藤佳代子、浅沼秀樹、板村繁之、田代真人]

#### 5. インフルエンザワクチンの新規免疫原性解析法の開発

インフルエンザワクチンの免疫応答を抗体遺伝子のレパトアおよび抗体誘導の量的、質的差異について網羅的に解析するために、次世代シーケンサーを用いて手法の確立を行った。まず、誘導されてくる抗体遺伝子のレパトアが詳細に解析されているハプテン・キャリアをモデルとして解析を実施したところ、既知の抗体遺伝子のレパトアが使用されていることを見出すことができた。このように抗体遺伝子のレパトアを網羅的に解析できるシステムをほぼ確立することができた。確立させたシステムを用いてワクチンの剤型の違い及びウイルスの馴化変異によって誘導される抗体応答について抗体遺伝子のレパトアおよび抗体誘導の量的、質的差異について解析して、ワクチンの特性とどのように関連しているのか明らかにしていく計画である。

[河野直子、板村繁之、大西和夫\*、田代真人：\*免疫部]

#### 6. H7N9 鳥インフルエンザウイルスのワクチン製造候補株の開発

2013 年 3 月に報告された中国での H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染を受けて、当該ウイルスに対する鶏卵培養ワクチン製造用ウイルス株を開発した。中国 CDC から分与されたヒト分離株、A/Anhui/1/2013 を基に Reverse Genetics 法により、HA、NA 遺伝子が A/Anhui/1/2013 株由来、残りの遺伝子が PR8 株由来のリアソータントウイルス NIIDRG-10.1 を作出した。ワクチン株としての妥当性を検証するためには、抗原性・免疫

原性を確認する必要がある、フェレット感染血清（抗 A/Anhui/1/2013、抗 NIIDRG-10.1）の作出も行なった。

作出した NIIDRG-10.1 は限界希釈法によりウイルスの純化を行い、SPF 鶏卵で三継代後の株をマスターストックとして保存した。マスターストックウイルスに対しては、遺伝子配列の決定、HI 試験、HA 収量の測定、鶏胚致死性試験、フェレットを用いた安全性試験などの各種試験を実施し、ワクチン株としての妥当性を確認した。SPF 鶏卵での四継代株（ワーキングストック）を配布用に保存した。NIIDRG-10.1 株は、配布可能ワクチン製造候補株として WHO に報告し、WHOERL で検討の後、ワクチン製造候補株として承認、登録された。

[中村一哉、白倉雅之、今井正樹、浅沼秀樹、鈴木康司、内藤忠相、武藤亜紀子、信澤枝里、田代真人]

#### 7. A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスに対するフェレット感染血清の作製

2013 年に中国で発生した A (H7N9)鳥インフルエンザウイルスの抗原性解析を実施するため、フェレット感染血清を作製した。中国 CDC より分与された A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Shanghai/1/2013 (H7N9)の 2 株、H7 型参照血清として、A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)、A/duck/Fukui/1/2004 (H7N1)の 3 株に対する抗血清を作製した。[今井正樹、岸田典子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人]

#### 8. 細胞培養ワクチン種株用ベクターの開発

パンデミック発生時のワクチン種株作製には迅速性が求められる。そのため、種株（リアソータントウイルス）の作製にはリバースジェネティクス (RG) 法を用いるのが適している。現在、鶏卵培養ワクチン種株作製用の高増殖母体ウイルスベクターは開発されているが、実用化に適した細胞培養ワクチン種株作製用母体ウイルスの開発はされていない。そこで細胞培養ワクチン製造用母体ウイルス候補として A/Udm/371/72(H3N2)と A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)について、ATCC-MDCK 細胞への馴化と増殖性の検討を行った。その結果、20 代継代後の A/Udm/1/73 株は細胞馴化と見られるアミノ酸変異を獲得し、約  $10^8$  pfu/mL のウイルス力価を示した。A/PR/8/34 株 20 代継代後に細胞馴化と見られるアミノ酸変異を獲

得し、約  $10^9$  pfu/mL のウイルス力価を示した。今後はこれらを母体ウイルスとしたリアソータントウイルスを作出し、有用性を検討していく。

[鈴木康司、信澤枝里、田代真人]

#### 9. 鶏卵培養用 H7N9 ワクチン製造候補株の MDCK 細胞における増殖性と細胞培養用ワクチン製造株としての妥当性の検討

鶏卵培養用 H7N9 ワクチン製造候補株 2 株（当研究室が開発した NIID-RG10.1 と National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) が開発した NIBRG-268) について、細胞培養ワクチン開発用の ATCC-MDCK 細胞における増殖性を検討した。どちらのウイルスも ATCC-MDCK 細胞で増殖したが、ウイルス力価は  $10^6$  pfu/mL 程度であった。現状の低い増殖性では細胞培養用のワクチン製造株として用いるには妥当でないことが示唆された。

[鈴木康司、信澤枝里、田代真人]

#### 10. H5N1 型ウイルスワクチン製造候補株のフェレットを用いた安全性試験

H24 年度、インドネシアにおいてヒトから分離された A/Indonesia/NIHRD11771/2011(H5N1)を元株とし、RG 法によりウイルス製造候補株 (NIIDRG-9) を作製した。今年度は、この候補株に対してフェレットを用いて病原性試験を実施した。WHO の指針に即し、フェレットに元株または NIIDRG-9 株をそれぞれ経鼻接種し、感染 3 日、14 日後に解剖を行い、各臓器でのウイルス力価測定と病理学的検査を行った。その結果、元株接種群と比較し、NIIDRG-9 接種群では体重減少率、臨床症状の軽減が認められた。また、採取した臓器（鼻甲介、肺、脾臓、腸管、脳、嗅球）のウイルス力価を測定した結果、元株接種群では、鼻甲介、肺、嗅球においてウイルスが検出された。一方、NIIDRG-9 接種群では、鼻甲介のみでウイルスが検出されたが、他の臓器では検出されなかった。さらに、病理学的所見における肺病変の程度は、元株接種群に比べ、NIIDRG-9 接種群では軽度であった。以上の結果から、RG ワクチン製造株である NIIDRG-9 株のフェレットにおける病原性は、元株と比較して、低いことが示された。

[白倉雅之、今井正樹、中村一哉、永田典代、岩田奈緒子、鈴木忠樹、長谷川秀樹、信澤枝里、田代真人]

#### 11. 2013 年度 H5N1 備蓄ワクチン株選定資料の作成

(i) H5N1 備蓄ワクチン株のうちベトナム株 (clade 1)/インドネシア株 (clade 2.1.3.2) は、平成 25 年度末で期限が切れる。そこで、最近ヒトから分離された各クレードのウイルスが、備蓄ワクチン株の被接種者の抗体により認識されるのかを検討し、備蓄ワクチン株の更新の必要性を検討するための資料を作製した。

試験は、近年ヒトから分離された clade 1 の A/Vietnam/VP09-26H/2009, A/Vietnam/VP12-03/2012, A/Vietnam/CD12-76H2012, clade 2.1.3.2 の A/Indonesia/NIHRD11771/2011, A/Indonesia/NIHRD11931/2011, A/Indonesia/12379/2012 の各株と、各クレードの H5N1 備蓄ワクチン (A/Indonesia/5/2005(CDC-RG2) あるいは、A/Vietnam/1194/2004(NIBRG-14)) を接種した被験者の血清抗体を用いて行なった。その結果は、厚労省のワクチン作業班において検討され、2013 年度の備蓄株は、従来のワクチン株を再備蓄し、株の更新は行わないことが決定された。[白倉雅之、内藤忠相、武藤亜紀子、信澤枝里、田代真人]

(ii) (i) の資料作成に際し、検討株をワクチン製造用種株候補として扱うため、一部の法律の適用除外、またウイルスの製造所への分与に必要な手続き及び手続きの一部変更を下記のように行った。1. 感染症法に基づく特定病原体からの除外の申請 (厚労省) 2. ナチュラルオカレンス株としての承認申請 3. 家伝法の家畜伝染病原体からの除外申請。[信澤枝里、田代真人]

#### 12. 細胞培養法による MDCK-NIID 細胞からのウイルス分離効率の解析

GMP 準拠使用を目的として品質保証された MDCK 細胞株 (MDCK-NIID) において、2010/2011 及び 2011/2012 シーズンの臨床検体からの A/H1N1pdm09 亜型株 (H1pdm)、A/H3N2 亜型株 (H3)、B/Victoria 系統株 (B/Vic)、B/Yamagata 系統株 (B/Yam) についてウイルス分離効率を検討し、ウイルス分離用基材としての有用性を評価した。その結果、比較対照として用いた従来の MDCK 細胞株 (MDCK-Conv) と同等の高いウイルス分離効率を示し、ウイルス分離用基材としての有用性が示された。[浜本い



つき、中村一哉、原田勇一、高橋 仁、田代真人、小田切孝人、山本典生]

### 13. 細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、ワクチンシード候補株の抗原性が維持されない可能性がある。分離ウイルスの遺伝的安定性に関するデータを集積し問題を解決する方法の策定につなげることを目的として、インフルエンザウイルスの A(H1N1)pdm09 株と H3N2 株、B/Victoria および B/Yamagata 系統株に関して解析を行った。無血清培地に馴化させた MDCK 細胞を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、各型・亜型ウイルス株の全てで HA 遺伝子に変異導入がみられた。培養細胞を用いて分離・継代したウイルス株は遺伝的安定性が保持されにくいことが明らかとなり、今後これらの変異と抗原性変化の関連について調べていくことが重要であると考えられた。[高橋 仁、中村一哉、浜本いつき、原田勇一、田代真人、山本典生]

### 14. 細胞培養法により分離されたウイルスの抗原的安定性についての解析

ワクチンシードウイルス分離用候補細胞から分離・継代したウイルスの HA 遺伝子上に鶏卵継代株では抗原性に大きな変化がもたらされることが知られている変異と同様の変異を生ずる株が有り、分離ウイルスに鶏卵馴化と類似した抗原変異が起こることが危惧された。そこで遺伝子変異を起こしたウイルスに対する抗血清を作製し、分離ウイルスの抗原性を評価したところ、その抗原性に大きな変化は観察されず、候補細胞分離株では当該遺伝子変異がウイルスの抗原性に大きく寄与しない可能性が示唆された。[原田勇一、高橋 仁、田代真人、山本典生]

### 15. 細胞培養ワクチン製造用シードウイルス分離用候補細胞の評価

独自に開発した細胞培養ワクチン製造用シードウイルス分離用候補細胞について、少量から多量まで様々な量の A(H1N1)pdm09 ウイルスを含む臨床検体を用いてウイルス分離効率の評価を行った。その結果、ウイルス含有

量の低い臨床検体からのウイルス分離効率はコントロールとして用いた MDCK 細胞より低く、臨床検体中に含まれるウイルス量が通常の MDCK 細胞より多く必要である事を示唆する結果が得られた。今後、再現性も含めたさらに詳細な解析が必要である。[原田勇一、高橋 仁、中村一哉、浜本いつき、田代真人、山本典生]

### 16. 細胞培養型 A(H9N2)インフルエンザワクチンの有効性を評価するために必要な基礎的検討について

国のパンデミック対策として新規インフルエンザワクチン開発・生産体制整備事業が進行中である。この事業の一環として試作された細胞培養型 A(H9N2)インフルエンザワクチンについて、マウスモデルを用いた有効性の評価法の検討を行った。本ワクチンの効果の指標としてはマウス肺中ウイルス増殖の抑制を経時的に観察することが適当と考えられ、この方法を用いて次年度に試作ワクチンの有効性評価を行うこととした。[原田勇一、高橋 仁、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生]

### 17. 迷入ウイルス検出系の確立に関する研究

細胞培養ワクチン用シードウイルスの安全性を確保することを目的として、迷入ウイルス検出系の確立に関する研究を行った。シードウイルスへの混入可能性が高いウイルス及びヒトに病気を引き起こす可能性が高いウイルスを選択し、これらに対する定量 PCR 用のプライマー・プローブとスタンダード用核酸を構築した。これによって迷入ウイルス否定試験の基盤形成を進めた。

[山本典生、中村一哉、原田勇一、浜本いつき、高橋 仁、田代真人]

### 18. シードウイルス製造用 MDCK セルバンクの安全性・特性についての解析

MDCK 細胞 (ATCC から購入) を無血清培地に馴化させ、GMP に準拠した条件下でマスターセルバンク、ワーキングセルバンク、および EOPC の構築を行った。これについて今年度は迷入因子否定試験 5 項目と Oncogenicity 試験 (結果の解析) を行い、特に問題点を認めなかった。以上から、この MDCK セルバンクはこれまで実施してきた 36 項目の安全性試験・特性試験で問題がないことが明らかとなり、臨床検体からのシードウイ

ルスの分離、リバーシジェネティクスによるシードウイルス作製などに使用することが可能と考えられた。[山本典生、田代真人]

#### 19. 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析

現行インフルエンザワクチンにより誘導される全身性のウイルス特異的 IgG 抗体応答に加えて、感染の場となる上気道粘膜上にウイルス特異的 IgA 抗体を誘導できる経鼻インフルエンザワクチンは、感染防御効果が高いことと考えられている。免疫機構が未成熟である乳幼児においては、ワクチン接種を行っても有効な抗体産生が誘導されにくいという問題点があり、効果的なワクチン方法が必要とされている。そこで母親由来の抗体が新生児へ移行する母子免疫に注目した。A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, A(H1N1))の不活化ワクチンを経鼻あるいは皮下接種した雌 BALB/c マウスと雄マウスと交配した。これでの解析から、出産後の母乳中には、経鼻接種群では IgA 抗体、皮下接種群では IgG 抗体が高い傾向にあることを明らかにした。本研究では、同様にワクチン接種を施した親マウスから生まれた生後 21 日目の仔マウスに対し、A/PR8 ウイルスを肺に感染させ生残率と体重変化を測定した。ワクチン非接種個体から生まれた仔マウスは体重減少を伴い死亡したが、ワクチン接種（皮下ならびに経鼻）個体から生まれた仔マウスは体重の増加が認められ、生残することが明らかになった。母親マウスに対するワクチン接種の違いにより、誘導される抗体応答に違いがあるものの、いずれの場合でも仔マウスへの致死的な感染に対する防御効果が得られることが示された。[泉地恭輔[研究生]\*、相内 章、鈴木忠樹\*、浅沼秀樹、田村慎一\*、田代真人、長谷川秀樹\*：\*感染病理部]

#### 20. 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせと抗体応答

高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)が原因となるパンデミックに対応すべく、いくつかのウイルス株由来のワクチンが準備されている。本研究では、経鼻インフルエンザワクチン接種において初回ならびに 2 回目の接種で用いる A(H5N1)ワクチン株の組み合わせることで、誘導される抗体応答を評価した。一群 5 匹の 6~8 週

齢の雌 BALB/c マウスに対して、合成二本鎖 RNA を粘膜アジュバントとして、A(H5N1)全粒子不活化ワクチンを一匹あたり 0.2 µg HA/8 µl (片鼻 4 µl) の経鼻接種を行った。ワクチン接種は 3 週間隔で 2 回行い、初回接種と 2 回目接種で用いるワクチンは A/Vietnam/1194/04 (VN)、A/Indonesia/5/05 (IN)、および A/Anhui/1/05 (AN) 由来の全粒子不活化ワクチンを組み合わせて用いた。2 回目のワクチン接種から 2 週間後の血清ならびに鼻腔洗浄液を回収し、各ワクチンに対する抗体応答を評価した。AN 株由来ワクチンに対する血清中 IgG 抗体応答は、初回免疫で AN 株を用いた群で高く、中でも IN 株で 2 回目のワクチン接種を行った群で最も高かった。また、VN 株由来ワクチンに対する血清中 IgG 抗体応答には大きな差は認められなかったが、初回-2 回目接種の組み合わせが VN-VN、VN-IN、AN-IN の順に高い傾向にあった。以上のことから、A(H5N1)経鼻インフルエンザワクチン接種による血清中 IgG 抗体応答に関しては、初回 AN 株-2 回目 IN 株の組み合わせによる接種が優れている可能性が示唆された。[相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹\*、原田勇一、田村慎一\*、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹\*：\*感染病理部]

#### 21. 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響

経鼻インフルエンザワクチンの効果は、主にインフルエンザウイルスに対してナイーブなマウスを用いた実験で明らかにされてきた。しかし、マウスと異なりヒトは過去のインフルエンザウイルス感染やワクチン接種の影響により、ナイーブではない。本研究では、マウスにおいて感染あるいはワクチン接種により構築された基礎免疫が、その後の経鼻ワクチンにより誘導される抗体応答に与える影響を検討した。A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, A(H1N1))感染、A/Narita/1/09 (A/NRT, A(H1N1)pdm09) 感染、A/PR8 あるいは A/NRT 全粒子不活化ワクチンを接種し、基礎免疫を構築した 9~10 週齢の BALB/c マウスに対して A/NRT 全粒子不活化ワクチン接種の経鼻あるいは皮下接種を行った。その 2 週間後にこれらマウスに A/NRT による上気道感染を行い、感染 3 日後のウイルス価、ヘマグルチニン(HA)に対する抗体応答について検討した。A/NRT による感染歴がある場合には、A/NRT 皮下

あるいは経鼻ワクチン接種でも、その後の A/NRT 攻撃感染を完全に防御することができた。A/PR8 による感染歴がある場合には、皮下ワクチン接種と比べて経鼻ワクチン接種の方が有意に A/NRT 攻撃感染後のウイルス増殖を抑制できることが明らかとなった。基礎免疫を有する個体においても上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を強く誘導することで、皮下ワクチン接種に比べて経鼻ワクチン接種の方が優れたワクチン効果を発揮する可能性が示唆された。[池田千将[研究生]\*、相内 章、伊藤良[研究生]\*、鈴木忠樹\*、田村慎一\*、荒尾雄二郎\*\*、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹\*：\*感染病理部、\*\*岡山大学大学院保健学研究科]

## 22. 健康人ボランティアにおける経鼻インフルエンザ A(H5N1)ワクチン接種による抗体応答

高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)全粒子不活化ワクチンの経鼻接種により誘導される抗体応答を、健康成人のボランティアを募った臨床研究により検討した。成人ボランティア計 63 名を、噴霧したワクチンの流動性を抑える粘稠剤 CVP の添加の有無で二群に分け、A/Indonesia/5/05 株由来の全粒子不活化ワクチン (IBCDC-RG2、45 µg HA/dose) を 3 週間間隔で 2 回経鼻接種し、約 8 ヶ月後に追加ワクチン接種を実施した。血清中の A/Indonesia/5/05 に対する中和抗体応答は、CVP 添加群で高いものの有意な差は認められなかったが、4 倍以上の陽転が認められ被験者の割合は約 85%となった。今回、鼻腔洗浄液中の中和抗体価の測定を行った。この結果、CVP 添加群では 10.5 倍の上昇率(陽転は 76.0%)、非添加群では 4.6 倍の上昇(陽転は 58.3%)となり、その間に優位な差が認められた。粘稠剤 CVP の添加は、鼻腔粘膜上の抗体応答誘導に効果がある事が考えられた。[相内 章、Elly van Riet、田村慎一\*、鈴木忠樹\*、伊藤良[研究生]\*、川口晶\*、池田千将[研究生]\*、泉地恭輔[研究生]\*、浅沼秀樹、佐多徹太郎\*、田代真人、長谷川秀樹\*：\*感染病理部]

## 23. 細胞培養インフルエンザワクチン種株選定のための評価基準構築に関する研究

本研究は細胞培養法を用いてインフルエンザワクチンを製造する場合の種株の選定基準を構築することを目的

としている。昨年度までに臨床検体から分離・継代した H3N2 株の性状解析を終え、継代による増殖性に変化がないことおよび HA 価と蛋白回収量に相関性が乏しいことを示した。引き続き抗原性がリファレンス株と類似の 6 株 (N273、N284、N316、N321、N337、N382) をフェレットに感染させ、抗体応答を検討した。その結果、N284、N316、N321 株を感染させたフェレット抗血清では、各株ならびにその継代株に対する抗原性の違いは認められなかったが、N273、N337、N382 株を感染させたフェレットでは他の株との抗原性の違いを検出した。興味深いことに、N273、N337、N382 株の抗血清で N284 株およびその継代株の抗原性を解析した場合には、継代株の方が抗原性の違いが顕著になっている傾向が認められたのに対し、N284、N316、N321 株の抗血清を用いた場合には、継代前の株だけでなく継代株をも抗原性の違いが検出できないという結果であった。すなわち、リファレンス株を用いて各株の抗原性を解析した場合には、全ての株が類似の抗原性と認識されるが、各株の抗血清を用いた場合には、必ずしも抗原性が一致し得ないことが示された。引き続き、本血清を用いた臨床分離株の抗原性解析ならびに不活化抗原による応答性の解析を行う。[浅沼秀樹、相内 章、佐藤佳代子、岸田典子、許斐奈美\*、湯浅德行\*\*、山口陽子\*\*\*：\*日本大学・医、\*\*東京化成工業、\*\*\*東海大学]

## レファレンス業務

### 1. サーベイランスキット作製と国内への配布

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のレファレンスウイルスから不活化抗原とウサギ免疫血清を作製して、型/亜型/系統を同定するためのインフルエンザウイルスサーベイランスキットとして、70 カ所余の地方衛生研究所に配布した。本キットにより同定されたウイルスの分離情報は地衛研で病原体検出情報システムに登録され、その情報は地衛研から当室へのウイルス提供に際して有効に活用された。提供されたウイルスについて詳細な抗原性解析、遺伝子解析を行いインフルエンザの流行予測およびワクチン株選定の資料とした。[岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

## 2. フェレット抗血清作製とサーベイランスキットの海外への配布

A(H1N1)pdm09(卵株)、A(H3N2)(細胞株)、B/Victoria(細胞株)系統、B/Yamagata(細胞株)系統のレファレンスウイルスを用いてフェレット感染血清と不活化抗原を15キット作製し、抗原性解析用インフルエンザウイルスサーベイランスキットとして、わが国周辺諸国(中国、台湾、韓国、ミャンマー、モンゴル、ラオス、ネパール)に配布した。本キットを用いて各国で初期解析されたウイルスの提供を受け、さらに詳細な抗原性解析、遺伝子解析を行い、WHO および国内向けワクチン株選定会議へ情報提供した。[徐紅、岸田典子、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

## 3. インフルエンザ株サーベイランスコア・サポート地衛研-感染研共同研究連携網の運用

衛生微生物技術協議会感染症部会から推薦された全国6地方ブロック代表地衛研およびそれらを支援する5つの地衛研からなる、インフルエンザ株サーベイランスコア・サポート地衛研と感染研インフルエンザウイルス研究センターとの検査・サーベイランス技術開発共同研究体制が稼働4年目を迎えた。今年度は、2013年4月に緊急配布したA(H7N9)ウイルス遺伝子検出キットについての検出感度の確認を行った。また、全国74ヶ所の地衛研を対象にしたインフルエンザウイルス核酸診断検査法(リアルタイムRT-PCR法)についての第1回全国地衛研外部精度管理(EQA)および全国地衛研におけるインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点の把握を目的としたアンケート調査を立案・実施した。[小田切孝人、影山努、今井正樹、岸田典子、高下恵美、中内美名、高山郁代、高橋仁、皆川洋子\*、安井善宏\*、長野秀樹\*\*、高橋雅輝\*\*\*、川上春春\*\*\*\*、林志直\*\*\*\*\*、滝沢剛則\*\*\*\*\*、加瀬哲男\*\*\*\*\*、田中智之\*\*\*\*\*、戸田昌一\*\*\*\*\*、千々和勝己\*\*\*\*\*、喜屋武尚子\*\*\*\*\* : \*愛知県衛生研究所、\*\*北海道衛生研究所、\*\*\*岩手県環境保健研究センター、\*\*\*\*横浜市衛生研究所、\*\*\*\*\*東京都健康安全研究センター、\*\*\*\*\*富山県衛生研究所、\*\*\*\*\*大阪府公衆衛生研究所、\*\*\*\*\*堺市衛生

研究所、\*\*\*\*\*山口県環境保健センター、\*\*\*\*\*福岡県保健環境研究所、\*\*\*\*\*沖縄県衛生環境研究所]

## 4. インフルエザワクチンの力価測定用標準抗原国際キャリブレーション

WHO ERLとして、ワクチンの力価測定用標準抗原に関する国際キャリブレーションを実施した。具体的には、A/Texas/50/2012(X-223)(H3N2)、A/Texas/50/2012(X-223A)(H3N2)、A/Texas/50/2012(X-223A)(H3N2)-cell derived、B/Massachusetts/02/2012、B/Massachusetts/02/2012(BX-51B)、B/Massachusetts/02/2012(BX-51B)-cell derived、A/Indonesia/05/2005(IBCDC-RG2)(H5N1)、A/Shanghai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32Aについて、新規ロットの標準インフルエンザHA抗原に含有されるHA抗原の含有量の設定を、英国、豪州、米国の生物製剤に関する国立試験研究機関であるNIBSC、TGA、CBERと共同で実施した。[嶋崎典子、原田勇一、高橋仁、板村繁之、田代真人]

## 5. インフルエンザHAワクチンの国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

平成25年度のインフルエンザHAワクチンに使用するワクチン株であるA/California/7/2009(X-179A)(H1N1pdm09)、A/Texas/50/2012(X-223)(H3N2)、B/Massachusetts/02/2012(BX-51B)の3株について国家検定の力価試験に使用する参照抗インフルエンザHA抗血清と標準インフルエンザHA抗原(一元放射免疫拡散試験用)を作製し、標準抗原に含有されるHA抗原の含有量、及び参照抗血清の至適濃度の設定を実施し、本年度国内標準品として制定した。[嶋崎典子、佐藤佳代子、原田勇一、高橋仁、板村繁之、田代真人]

## 6. 標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)の作製

使用期限をむかえる標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)について、新規ロットを作製し、含有される抗原のCCA 価を測定し、本年度国内標準品として制定した。[嶋崎典子、高橋仁、鈴木康司、板村繁之、田代真人]

## サーベイランス業務

1. 2013/14 シーズンのインフルエンザウイルス国内流行株の抗原性解析

全国の地衛研から提供を受けた、A(H1N1)pdm09 は 191 株、A(H3N2)は 120 株、B/Yamagata 系統 86 株、B/Victoria 系統は 70 株について赤血球凝集抑制試験により抗原性解析を行った。2013/14 シーズンは A(H3N2)ウイルスの流行が先行したが、2014 年初頭から A(H1N1)pdm09 の流行が拡大し主流を占めた。B 型ウイルスでは Yamagata 系統株と Victoria 系統株の流行の割合は 2:1 であった。A(H1N1)pdm09 分離株のほとんどはワクチン株である A/California/7/2009 類似株であった。A(H3N2)分離株は当初 99%がワクチン株の A/Texas/50/2012 に類似していたが、流後期後半に抗原変異株と推定される株が一定の割合で出現してきた。Yamagata 系統についてはワクチン株 B/Massachusetts/02/12 から抗原性の変化はなかった。ビクトリア系統は 2 シーズン前のワクチン株 B/Brisbane/60/08 と抗原性の類似した株が大勢を占めた。[岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

2. アジア地域および近隣諸国で分離されたインフルエンザウイルス流行株の抗原性解析

WHO インフルエンザ協力センターとして、東南アジア諸国および近隣諸国から 81 株（台湾 26 株、ミャンマー 11 株、ラオス 23 株、ネパール 13 株、モンゴル 4 株、ベトナム 4 株）のインフルエンザ分離株を入手し、遺伝子解析および抗原性解析を行なった。これらの国では A(H1N1)pdm09 の流行拡大が認められ、次いで A(H3N2)、B 型ウイルスという割合で流行が観察されたが、流行状況については各国による差異が認められた。A(H1N1)pdm09 流行株は、ワクチン株 A/California/07/2009 の類似株が主流を占めた。A(H3N2)ウイルスの多くはワクチン株 A/Texas/50/2012 の類似株であった。B 型ウイルスではビクトリア系統と山形系統が混合流行し、前者は B/Brisbane/60/2008 類似株が、後者は B/Massachusetts/02/2012 類似株が主流であった。これらの解析結果は、ウイルス提供国へ還元され、近隣諸国と感染研の連携による WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークおよび WHO インフルエンザワクチン株選定に貢献した。[徐紅、岸田

典子、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

3. 2013/14 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の遺伝子解析

インフルエンザウイルスの HA と NA 遺伝子の変化に関する情報は、次シーズンのインフルエンザ流行予測とワクチン株選定時の基盤となり、公衆衛生上極めて重要な役割を担っている。このため、現在流行している A(H1N1)pdm09 亜型、A(H3N2)亜型、B 型分離株について、全国地衛研の協力の元に、HA 及び NA 遺伝子の系統樹解析を行っている。13/14 シーズンに流行の主流であった A(H1N1)pdm09 亜型は、HA 遺伝子系統樹上で D97N, K283E, E499K を持つクレード 6 に属した。さらにクレード 6 内で、主流であったサブクレード 6B(K163Q, A256T)と、6C(V234I)に分かれた。これらのサブクレード間に抗原性の違いは見られなかった。A(H3N2)亜型は、HA 遺伝子系統樹上でクレード 3C.2 (N145S, A198S, D489N)とクレード 3C.3 (T128A, R142G, N145S, A198S)に属した。3C.2 には 3C.2a (N144S, F159Y, K160T, N225D, Q311H) が、また 3C.3 には 3C.3a (A138S, F159S, N225D) の形成が認められた。B 型では、ビクトリア系統は全て 2011/12 シーズンのワクチン株 B/Brisbane/60/2008 に代表されるクレード 1A(N75K, N165K, S172P)に属した。山形系統は、今シーズンのワクチン株 B/Massachusetts/02/2012 株に代表されるクレード 2 (R48K, P108A, T181A, S229G)または、昨シーズンのワクチン株 B/Wisconsin/01/2010 に代表されるクレード 3 (S150I, N165Y, S229D)に属した。NA 解析では、A(H1N1)pdm09 亜型の NA に H275Y を持つオセルタミビル耐性株の散発的検出に加え、札幌市を中心とした限定的な地域流行も確認された。A(H3N2)亜型および B 型分離株からは薬剤耐性アミノ酸置換は検出されなかった。なお、解析した遺伝子配列はインフルエンザウイルスデータベース GISAID へ登録している。[藤崎誠一郎、高下恵美、岸田典子、徐紅、中村一哉、今井正樹、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、小田切孝人、田代真人]

4. インフルエンザウイルス流行株の抗インフルエンザ

## 薬感受性試験

日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であることから、薬剤耐性ウイルスの検出状況を逐一把握し、速やかに情報発信することは公衆衛生上極めて重要である。そこで我々は全国地衛研と共同で、日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施している。平成25年度には、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの4薬剤を対象として、A(H1N1)pdm09分離株182株、A(H3N2)分離株83株、B型分離株56株を解析した。その結果、札幌市を中心にH275Y耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが地域流行していることが明らかになった。薬剤耐性株サーベイランスで得られた結果は、NESID（感染症サーベイランスシステム）を通して毎週、各関係機関に情報提供した。また感染症疫学センターのIASRウェブサイトにおいて毎週一般公開し、耐性株の流行状況に関する情報提供を行った。さらに毎月FluNetを通して日本国内における耐性株検出状況を報告し、WHO世界インフルエンザ監視対応システム（GISRS）への情報提供を行った。[高下恵美、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、中村一哉、今井正樹、江島美穂、伊東玲子、三浦舞、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、小田切孝人、田代真人]

## 5. 株サーベイランス体制の強化に関する研究

地方衛生研究所（地衛研）におけるインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するために、全国73カ所の地衛研を対象にアンケート調査を実施し、72カ所の地衛研から回答が得られた。過去の3シーズン（2010/11、2011/12、2012/13）におけるインフルエンザウイルスの分離効率をたずねたところ、3シーズン連続して分離効率の低い研究機関が幾つかあったが、ほぼ半数の研究機関が高い効率で分離していた。また、日本全体では分離効率が経年的に下降している傾向もみられなかった。ほぼ全ての研究機関がウイルス分離に用いる培養細胞を概ね適正に維持管理していることがわかった。一方、人事異動によって担当職員が定期的に入れ替わることから、地衛研でのウイルス検査技術に関する知識や技術の継承が非常に困難になりつつあるとの意見が多数寄せられた。現段階では日本のインフルエンザウイルス株サーベイランスは有効に機能している。しかし、今後、

地衛研組織の弱体化が一層進行すれば、そのシステムが機能しなくなる可能性は十分にある。国-地方自治体-感染研が連携して、この問題に取り組む必要がある。[今井正樹、岸田典子、小田切孝人]

## 6. 我が国に飛来する野生水禽におけるA型鳥インフルエンザウイルスの保有調査

2003年末以降、東アジアの家禽で発生したH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが東南アジア、中近東、アフリカ、ヨーロッパへと拡散した。この感染拡大経路は渡り鳥の飛行ルートとも関連していることから、渡り鳥によってこれら鳥インフルエンザウイルスが我が国に持ち込まれる可能性がある。また、最近ではH7N7、H7N9、H6N1、H10N8、H9N2亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が東アジアで報告されており、鳥インフルエンザウイルスの国内での流行状況を把握する事は重要である。これらウイルスの我が国への侵入をモニターする目的で、今年度は全国5カ所の地方衛生研究所の協力のもと、渡り鳥における鳥インフルエンザウイルスの生態調査を行ったが、いずれの地方衛生研究所から分離報告はなかった。[高山郁代、影山努、田代真人]

## 7. 日本のブタにおける新型インフルエンザウイルスの発生の監視

全国10カ所の地方衛生研究所に依頼し、ブタの鼻腔あるいは気管から採取した拭い液をMDCK細胞に接種して、ブタからのインフルエンザウイルス分離調査を行った。本年度は、1件1株のA型インフルエンザウイルスが分離され、これらの分離株について全セグメントの遺伝子解析を行った結果、A(H1N2)亜型のブタインフルエンザウイルスである事が判明した。また、HA遺伝子はH1N1亜型ブタインフルエンザウイルス、NA遺伝子はH1N2亜型ブタインフルエンザウイルス、その他の遺伝子はA(H1N1)pdm09亜型に由来することがウイルス遺伝子の詳細解析により明らかとなり、由来の異なる3種類のウイルスの遺伝子再集合により新たに出現したと考えられた。[高山郁代、影山努、田代真人]

## 8. ベトナムにおいてヒトから分離されたA(H5N1)高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析

ベトナムでは、致死率の高い A(H5N1)高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染する事例が持続的に報告されており、今後、ウイルスが変異しヒト-ヒト感染が容易に起こる事が危惧されている。このような背景から、ベトナム国における A(H5N1)ウイルスのヒト感染事例を把握し、そのウイルスの性状解析を実施する事は、我が国の新型インフルエンザ対策において非常に重要であると考えられる。本研究では、2009年から2014年の間に、ヒトから分離された5株の A(H5N1)高病原性鳥インフルエンザウイルスと3例の臨床検体をホーチミン・パスツール研究所より入手し全セグメントの遺伝子解析を行った。また、分離できたウイルス株については抗原解析を行った。特に、近年(2014年1月)に分離された A/Vietnam/14011801/2014 株は、HA の遺伝子配列から Clade2.3.2.1c に属する事が判明し、抗原解析の結果より、同クレードの現行ワクチン製造株である IDCDC-RG30 株(Clade 2.3.2.1a)の抗血清に対しホモ価と比較して8倍程度低い事が判明した。従って2014年1月に分離された株は、既存のワクチン製造株とは、抗原性が異なる事が示された。[高山郁代、白倉雅之、中内美名、影山努、信澤枝里、田代真人]

## 品質管理に関する業務

### 1. インフルエンザ HA ワクチンの力価試験の精度管理及び規格確認

インフルエンザ HA ワクチンは毎年ワクチン株が見直しされるため、ワクチンの国家検定の力価試験として実施されている一元放射免疫拡散試験の測定精度が一定の範囲内にあるように毎年確認して調整する必要がある。また、マウス白血球数減少試験や蛋白質含量試験において生物製剤基準の許容範囲の上限に近いために、毎年のワクチンが規格に適合しているのか確認する必要がある。そこで、本年も各ワクチン製造所で試作されたワクチンについて測定を実施して規格に適合していることを確認するとともに、各製造所の測定値との乖離について検討した。さらに参照インフルエンザ HA ワクチンを使用して各試験の測定精度についての検討を実施した。[嶋崎典子、原田勇一、河野直子、高橋仁、佐藤佳代子、板村繁之、楠英樹\*、福田靖\*\*、田代真人：\*血液安全性研究部、\*\*細菌第2部]

### 2. 新規インフルエンザワクチンの承認前検査の実施

製造販売承認申請のあった A/H5N1 ウイルスに対する細胞培養インフルエンザワクチン製剤3件について、承認前検査として当該製剤の試験検査を実施し、試験担当部屋の試験成績も含めて報告書を作成した。[原田勇一、嶋崎典子、高橋 仁、佐藤佳代子、板村繁之、田代真人]

### 3. 季節性インフルエンザワクチン製造用候補ウイルス株の品質管理試験の実施

2013-14年シーズンのインフルエンザワクチン製造用候補ウイルス株 A/H3N2 亜型3株の試験交付、A/H3N2 亜型、B型仮交付株のべ4株について、抗原分析及び HA、NA 遺伝子の遺伝子解析を実施して遺伝的・抗原的安定性を解析し、ワクチン製造用株としての適性を確認した。また、インフルエンザワクチン製造用シードウイルスとして作製、保存したウイルス検体の無菌試験を実施し、シードウイルスの品質の確認を行った。解析結果は、インフルエンザワクチン株選定のための検討会議等を通じて関係各機関と情報を共有した。[原田勇一、河野直子、佐藤佳代子、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、佐藤 彩、信澤枝里、小田切孝人、板村繁之、田代真人]

### 4. 季節性インフルエンザワクチン製造用種株候補の増殖、検討、交付

2014/2015 シーズン用ワクチン株を選定するため、候補株を輸入し、GMP 準拠施設内で、マスターストックおよびワーキングストックを作製、保存した[NIB-85, X-233, X-233A (H3N2), BX-53A, BX-53B, BX-53C, B/Texas/02/2013]。ワクチン製造所で増殖性の検討を行うため、H3N2 亜型、B型ともに2株を試験交付し、得られた成績をもとに A型 H3N2 亜3株、B型2株を仮交付し、2013/2014 シーズン用ワクチン株選定に供した。[白倉雅之、内藤忠相、鈴木康司、武藤亜紀子、信澤枝里、田代真人]

### 5. H7N9/2013 野生株、ワクチン製造候補株の輸入、増殖、検討。

H7N9 野生株 (A/Anhui/1/2013, A/Shanghai/1/2013, A/Taiwan/1/2013) およびワクチン製造用種株(IDCDC-RG32A, NIBRG-267,268)を輸入した。必要に応じて、BSL3 実験

室あるいは GMP 準拠施設内で、ウイルスを増殖させ遺伝子解析、抗原解析を行い、遺伝的、抗原的に輸入株と同等であることを確認後、保存した。[中村一哉、白倉雅之、高山郁代、影山努、信澤枝里、田代真人]

#### 6. H7N9 ワクチン株 NIIDRG-10.1 の国内外ワクチン製造所への分与と検討依頼

感染研で作製したワクチン株 NIIDRG-10.1 および輸入した NIBRG-267,268 に対する感染症法上の取り扱いの整備、MTA 締結等分与に必要な手続きを行った後、分与した。NIIDRG-10.1 は、国内ワクチン製造所における、増殖性等の検討、ワクチン種株としての妥当性の検討を依頼した。[信澤枝里、田代真人]

#### 7. シードウイルス製造用 MDCK セルバンクの GMP 管理に関する業務

GMP に準拠した条件下で作製した MDCK マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを、これまでに準備した培養細胞の保管・出庫に関する手順書等に従って GMP 管理の保管庫に移動し、細胞の GMP 管理を開始した。これにより、GMP 管理下での細胞培養ワクチン用シードウイルス作製体制の整備を進めることが出来た。[山本典生、原田勇一、中村一哉、浜本いつき、白倉雅之、高橋 仁、信澤枝里、板村繁之、田代真人]

### 国際協力関係業務

#### 1. WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークにおける流行株の 2 次元的抗原性分析への参加と協力

WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークメンバーである Cambridge 大学グループが開発した 2 次元的ウイルス抗原性分析法 (Cartography 法) を用いて、国内分離株の解析をするため、592 株(A(H3N2):197 株、B 型:191 株、A(H1N1)pdm09:204 株)の抗原解析データと 596 株(A(H3N2):166 株、B:203 株、A(H1N1)pdm09:227 株)のシーケンスデータを Cambridge 大学へ提供した。これらの成績は、WHO ワクチン株選定会議で協議され、ワクチン株選定に貢献した。[徐紅、岸田典子、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦美穂、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

#### 2. WHO 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス強化のためのワーキンググループへの参加

WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークの抗インフルエンザ薬耐性ワーキンググループのメンバーとして、世界規模の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施に向けた指針の更新作業を行った。指針は世界各国の WHO ナショナルインフルエンザセンターにおいて抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施する際の基本方針となるもので WHO ウェブサイトにおいて公開された。[高下恵美、影山努、小田切孝人、田代真人]

#### 3. 国際インフルエンザウイルスデータベース(GISAID)ワーキンググループへの参加およびデータベース改良への貢献

インフルエンザウイルスの国際データベース (GISAID)は、2006 年 8 月に構築・公開されたデータベースであり、ヒト及び鳥インフルエンザウイルスについての情報を各国の研究者に無償で提供することを目的としている。感染研を含め各国の GISAID 技術者が GISAID 利用上の問題点、要望などを定期的に提示し、これに基づいて順次、GISAID 機能のアップデートが進められている。[藤崎誠一郎、高下恵美、小田切孝人、田代真人]

#### 4. WHO 関連会議への出席とインフルエンザワクチン株選定に関する協議への参画

9 月と 2 月に WHO ジュネーブ本部で開催されたインフルエンザワクチン株選定会議へ出席し、国内および日本周辺諸国から収集したウイルスの性状、薬剤耐性株の検出状況、ワクチン接種後の抗体保有状況、交叉反応性などの情報提供をし、次年度のワクチン株選定を海外の WHO インフルエンザ協力センターと共に行った。[小田切孝人、今井正樹、岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央\*、山崎秀司\*、藤田信之\*、田代真人：\*独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部]

#### 5. WHO 西太平洋地域諸国に対するインフルエンザウイルス遺伝子解析方法トレーニングプログラムへの参画



平成 25 年 4 月 27 日から 5 月 4 日の期間にメルボルンにて開催された「Regional Training on Sequencing and Phylogenetic Analysis of Influenza Viruses for National Influenza Centre Laboratory Staff」にインストラクターとして参加した。WHO/WPRO 主催の本トレーニングにて、インフルエンザウイルスの遺伝子配列決定法、および遺伝子系統樹解析法を WHO/西太平洋地域諸国のインフルエンザウイルス解析担当者に指導した。[藤崎誠一郎]

#### 6. WHO A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロトコールに関する Working Group Meeting への参加

平成 25 年 7 月 2 日～3 日にジュネーブで開催された WHO A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロトコールに関する Working Group Meeting に参加し、WHO の A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロトコールのアップデートについてと諸外国のナショナルインフルエンザセンターに対して行っているインフルエンザウイルスの PCR 亜型診断の精度管理およびその継続性について、他の WHO インフルエンザ協力センター、WHO H5 リファレンスラボラトリー、ナショナルインフルエンザセンター、OFFLU と協議した。[影山 努、田代真人]

#### 7. A(H7N9)ウイルス検査法の情報提供

PCR 法を用いた A(H7N9)ウイルス検査法を WHO GIS RS 内で情報提供した。また、海外 6 カ所の NIC(National Influenza Center)に対し、リアルタイム RT-PCR 法ならびにコンベンショナル RT-PCR 法を用いた A(H7N9)検出系のプライマー、プローブ、陽性コントロールおよび反応試薬の配布を行った。[高山郁代、高橋仁、中内美名、影山努]

#### 8. 重症呼吸器感染症患者検体の病原体探索

ネパールで流行していた原因不明の重症呼吸器感染症について、患者から採取された 93 臨床検体がネパール NIC より送付された。送付された検体に対しては、インフルエンザウイルスを初めとした病原体の網羅的解析を行った。[影山努、黒田誠\*、片野晴隆\*\*、木村博一\*\*\*、中内美名、高橋仁、高山郁代、小田切孝人、田代真人：\*病原体ゲノム解析研究センター、\*\*感染病理部、\*\*\*感染症疫学センター]

#### 9. ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)における高危険度病原体の実験室診断能力強化への技術支援

ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)において国際協力機構(JICA)が実施している BSL3 実験室の供与と技術移転のプロジェクトに参加し、NIHE 及び地域研究所(ホーチミン・パスツール研究所、ニャチャン・パスツール研究所、タイグエン衛生疫学研究所) および Yen Bai 省、Thai Nguyen 省、Nghe An 省、Thua Thien Hue 省、Da Nang 市、Gia Lai 省、Dak Lak 省、Dong Nai 省、Tien Giang 省、Can Tho 市のパイロット省予防医療センター(PCPM)の職員を対象とした研修会「Workshop to identify novel influenza A(H7N9) by RT-PCR in Ho Chi Minh City (2013 年 8 月 20 日～21 日)」を開催し、鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの診断法などに関する講義および実技指導を行った。[影山努]

#### 10. 国際協力機構 (JICA) 研修への参画

JICA の主催する「ワクチン品質・安全性確保のための行政機能強化」研修に講師として参画し、季節性インフルエンザワクチンの品質管理について講義を行った。[原田勇一]

#### 11. インフルエンザワクチンの品質管理に関する WHO 関連会議への出席と国際協力に関する協議、技術改良への参画

9 月、2 月に開催された WHO のインフルエンザワクチン株選定会議に出席し、次シーズンのワクチン株選定に基づきワクチン候補株の準備状況とワクチンの品質管理試験に使用する標準抗原等の作製準備について協議した。また、WHO ERL の一員として 7 月、1 月に英国で開催されたインフルエンザワクチンの品質管理に関する国際会議に出席し、ワクチンの品質管理における課題等について協議した。また、WHO 主催によるワクチン製造所と ERL を含む関係者の電話会議に参加して情報提供を行った。[板村繁之]

#### 12. H7N9 野生株およびワクチン株の輸出入

2013 年 3 月に中国が報告した H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例に対応するため、当該ウイルスを

Pandemic Influenza Preparedness(PIP)の対象ウイルスとして WHO が定めた PIP の枠組みの規定に則り輸入、輸出行った。分与に関しては、WHOHQ への報告および分与依頼者に対しては、SMTA2 の主旨の説明と締結を促し、ウイルス分与後は、IVTM に登録を行った。

輸入：2013 年 3 月に中国で明らかとなった H7N9 鳥インフルエンザウイルス（ヒト分離株）3 株及ワクチン株 3 株の輸入を行った。

輸出：近隣諸国及びワクチン製造所からの依頼を受け、野生株および感染研で作製したワクチン株 NIIDRG-10.1 を WHO の PIP framework の制約の中で、輸出し、WHO への報告を行った。輸出に際して必要な手続きの整備を総務部調整課、国際協力センターの協力のもと行なった。[信澤枝里、田代真人]

### 13. 細胞培養ワクチン用種ウイルスの製造に関する国際的枠組みの構築に関する業務

細胞培養ワクチンは、鶏卵馴化による抗原変異を避けることができるため、鶏卵培養法により製造されたワクチンよりも有効性が高いと期待されている。しかし現状では鶏卵培養法により製造された種ウイルスしかないため、このままでは細胞培養ワクチンの利点を生かし切ることが出来ない。そこで、細胞培養ワクチン用種ウイルスを細胞培養法のみによって製造できるようにするために、他の WHOCC と協調して国際的な枠組みの構築を進めた。

[山本典生、原田勇一、中村一哉、浜本いつき、田代真人]

### 研修業務

1. 順天堂大学医学部「基礎ゼミ」の担当と実験技術研修  
順天堂大学医学部学生の「基礎ゼミ」を担当し、細胞培養、ウイルス感染、PCR 等の実験に関する技術研修を行った。[山本典生、柗元 巖\* : \*ゲノム解析センター]
2. 平成 25 年度国立感染症研究所医師卒後臨床研修  
10 月 23 日に実施された H25 年度の医師卒後研修にて、インフルエンザの講義を担当した。[小田切孝人]
3. インフルエンザウイルスに関する実験の習得ならびに見学（研修）

台湾 CDC からの要請を受け、平成 25 年 11 月 18 日-22 日に当センターにて Ji -Rong Yang (assistant researcher) の研修を行った。本研修ではインフルエンザのサバイランスに用いるフェレット抗血清の作成方法など、動物実験の基本技術を習得するための技術研修と、当所の施設見学が主な目的であった。[浅沼秀樹、相内 章]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

1. 欧文発表  
1) Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Kiselev, O., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richt, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Avian flu transmission research resumes. *Science* 339(6119) 520-521 2013 DOI: 10.1126/science.1235140 (2013)  
2) Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., O. Kiselev, Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richt, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu *Nature* 493: 460, 2013. doi:10.1038/nature11858 (2013)  
3) McKimm-Breschkin, J. L., Williams, J., Barrett, S., Jachno, K., McDonald, M., Mohr, P., Saiito, T., Tashiro, M. Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations

- in non-conserved residues of the neuraminidase. *J. Antimicrobial Chemotherapy*.68(10) 2210-2221 2013 doi: 10.1093/jac/dkt205 (2013)
- 4) Ainai, A., Tamura, S-I, Suzuki, T., van Riet, E., Ito, R., Odagiri, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 9(9) 1-8 2013.
- 5) Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System; Dwyer, D., Barr, I., Hurt, A., Kelso, A., Reading, P., Sullivan, S., Buchy, P., Yu, H., Zheng, J., Shu, Y., Wang, D., Lam, W., Aguon, A., Oliva, R.Q., Odagiri, T., Tashiro, M., Verasahib, K., Yusof, M. A., Nymadawa, P., Alexander, B., Gourinat, A.-C., J Grangeon, J.-P., Jennings, L., Huang, S., Horwood, P., Lucero, M., Roque, V. Jr., Suy, L. L., Cardon, P., Tandoc, A. III, Olveda, R. M., Chun, K., Park, Y.-J., Cutter, J., Lin, R., Low, C., Mai, L. T. Q., Balish, A., Kile, J., Mei, S., McFarland, J., Moen, A., Olsen, S., Samaan, G., Xi, X., Chea, N., Diorditsa, S., Feldon, K., Fox, K., Jamsran, M., Konings, F., Lewis, H. C., McPherson, M., Nilles, E., Olowokure, B., Partridge, J. Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region Western Pacific Surveillance and Response (WPSAR) *Journal* (2013). 4:51-59 2013. doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009 (2013).
- 6) Miyazaki, M., Nishihara, H., Hasegawa, H., Tashiro, M., Wang, L., Kimura, T., Tanino, M., Tsuda, M., Tanaka, S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441(4) 953-957 2013 DOI:10.1016/j.bbrc.2013.11.011
- 7) Barr, I. G., Besselaar, T. G., Cox, N. J., Daniels, R. S., Donis, R., Engelhardt, O. G., Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A., McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C., Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D., Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X., Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013-4) WHO recommendations for the viruses to be used in the 2013-14 Northern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. *Vaccine* 20;32(37) 4713-4725 2014
- 8) World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group: Bahl, J., Besselaar, T., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Cox, N., Claes, F., Davis, C. T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Guan, Y., Hamilton, K., Jang, Y., Kawaoka, Y., Kelso, A., McCauley, J., Mumford, E., Prajitno, T., Russell, C. A., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Shepard, S., Vijaykrishna, D., Webby, R., Webster, R., Wong, F. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 8(3) 384-388 2014 DOI: 10.1111/irv.12230 2014
- 9) Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. *J. Virol. Methods* 204 101-104 2014.
- 10) Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Oba, K., Kubo, H., Kaida, A., Tashiro, M., Kageyama, T. Real-time RT-PCR Assays for Discriminating Influenza B Virus Yamagata and Victoria Lineages. *J. Virol. Methods*. 205 110-115 2014 DOI:10.1016/j.jviromet.2014.04.016 (2014)
- 11) Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzuki, Y., Ainai, A., Nakatsu, Y., Nagata, N., Kanou, K., Komase, K., Nobusawa, E., Maenaka, K., Kuroda, M., Hasegawa, H., Kawaokaj, Y., Tashiro, M., Takeda, M. The host protease

TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication

of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J. Virol.* 88 5608-5616 2014 doi:10.1128/JVI.03677-13 (2014)

12) Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(1):pii: 20666.

13) Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T. Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):549-51.

14) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisefeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature.* 2013;501(7468):551-5.

15) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7(6):1390-9.

16) Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. *J Virol.* 2013;87(14):7874-81.

17) Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(15):20453-20468. 2013

18) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother.* 2013;19(5):891-895.

19) Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, Imai M, Hatta M, Nelson CW, O'Connor DH, Hughes AL, Neumann G, Kawaoka Y, Friedrich, TC. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat. Commun.* 2013;4:2636.

20) Imai M, Herfst S, Sorrell EM, Schrauwen EJ, Linster M, De Graaf M, Fouchier RA, Kawaoka Y. Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Res.* 2013;178:15-20.

21) Takemae N, Nguyen T, Ngo LT, Hiromoto Y, Uchida Y, Pham VP, Kageyama T, Kasuo S, Shimada S, Yamashita Y, Goto K, Kubo H, Le VT, Van Vo H, Do HT, Nguyen DH, Hayashi T, Matsui A, Saito T. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology* 158(4):859-876 2013

22) Kobayashi M, Takayama I, Kageyama T, Tsukagoshi H, Saitoh M, Ishioka T, Yokota Y, Kimura H, Tashiro M, Kozawa K. Novel Reassortant Influenza A (H1N2) Virus Derived from A (H1N1) pdm09 Virus Isolated from Swine, Japan, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 2013

23) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H,

- Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S. Imported Case of Acute Respiratory Tract Infection Associated with a Member of Species Nelson Bay Orthoreovirus. PLoS One. 9(3):25-34, 2014
- 24) Ato M, Takahashi Y, Fujiia H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- $\alpha$ -dependent apoptosis. Vaccine 31: 2184–2190 (2013)
- 25) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li TC. Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. J Gen Virol. 94: 2647-2656. 2013.
- 26) Takebe Y, Saucedo CJ, Lund G, Uenishi R, Hase S, Tsuchiura T, Kneteman N, Ramessar K, Tyrrell DL, Shirakura M, Wakita T, McMahon JB, O'Keefe BR. Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent in vitro and in vivo activity against hepatitis C virus. PLoS One. 8(5): e64449. 2013.
- 27) Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle. Jpn J Infect Dis. 66(4):276-83, 2013
- 28) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. Microbiol Immunol. 57(9):655-9, 2013
- 29) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. Infect Genet Evol. 18:168-73, 2013
- 30) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013 Aug;63(2):194-200.
- 31) Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Complete Genome of Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerging Infectious Diseases. 20(4):709-12. 2013.
- 32) Yoo W, Nakamura T, Asanuma H, Matsushita M. Molecular cloning, genomic structure and tissue distribution of EW135, a novel chicken egg white protein with group B scavenger receptor cysteine-rich domains. Immunogenetics 65(11):785-93. 2013.
2. 和文発表
- 1) 今井正樹、河岡義裕: 哺乳類間での H5N1 と H7N9 鳥インフルエンザウイルスの空気感染. インフルエンザ診療ガイド 2013-14. 2013;36-43.
- 2) 齋藤孔良、高下恵美. Q&A 耐性ウイルスの基準について教えてください. インフルエンザ. 2014;15:30.
- 3) 高下恵美、江島美穂、伊東玲子、三浦舞、小田切孝人、田代真人、大西麻実、川西稔展、西村秀一. 2013/14 シーズンに札幌市で検出された抗インフルエンザ薬耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルス. IASR. 2014;35:42-43.

4) 高下恵美、江島美穂、伊東玲子、三浦舞、藤崎誠一郎、中村一哉、岸田典子、徐紅、土井輝子、佐藤彩、菅原裕美、小田切孝人、田代真人、横山新吉、青木洋子、矢作一枝、的場洋平、水田克巳、池田辰也. 山形県で検出された抗インフルエンザ薬耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルス. *IASR* 2014;35:76-78.

5) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. A/H3 亜型, B 型インフルエンザウイルス重複感染により中枢神経症状をきたした 2 例. *感染症学雑誌*. 87(5):618-619, 2013

6) 板村繁之 インフルエンザ・パンデミック対策用ワクチン *小児科* 54(12) 1661-1668, 2013

7) 白倉雅之、今井正樹 H5N1 および H7N9 鳥インフルエンザの現状と新型インフルエンザの発生. *小児内科*, Vol.45, No.11, pp.1983-1988, 2013.

8) 山本典生、田代真人 新型インフルエンザ 予防接種 Q&A, *小児内科* Vol.45 増刊号, 549-551, 2013

9) 小田切孝人、田代真人 中国でヒトに感染した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの性状、検査系の開発およびワクチン開発とその問題点 *ウイルス* 63(2):233-240, 2013

## II. 学 会 発 表

### 1. 国際学会

1) Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T. A cell-based screening system to evaluate the susceptibility of influenza viruses to T-705 (favipiravir). 15th International Negative Strand Virus Meeting. Granada, Spain. June 2013.

2) Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A PB2-KO influenza virus-based bivalent vaccine protects mice against pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenge. 15th International Negative Strand Virus Meeting. Granada, Spain.

June 2013.

3) Nakamura K, Shirakura M, Muto A, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E. Development of candidate vaccine of A/Anhui/1/2013(H7N9) strain by reverse genetics system. *Options for the Control of Influenza VIII*. Cape Town, South Africa. September 2013.

4) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T. Detection of antiviral-resistant influenza viruses in Japan during pandemic and post-pandemic periods. *Options for the Control of Influenza VIII*. Cape Town, South Africa. September 2013.

5) Takahashi H, Ohnishi K, Takayama I, Nakauchi M, Nagata S, Tsunetsugu-Yokota Y, Tashiro M, Kageyama T. Development of monoclonal antibodies specific for H5 H A and their application to rapid and specific detection of influenza A/H5N1 virus. *Options for the Control of Influenza VIII*, Cape Town, South Africa. September 2013.

6) Kaida A, Kubo H, Iritani N, Takakura K, Sekiguchi J, Ohyama M, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Shiomi M, Yamamoto S, Goto K, Hase A, Kageyama T. High Proportion of Multiple Infections with Respiratory Viruses in Young Children with Acute Respiratory Tract Infections. *European Congress of Virology 2013*. Lyon, France. September 2013.

7) Shirakura M, Setiawaty V, Pawestri HA, Takayama I, Arita T, Imai M, Kawaguchi A, Nakamura K, Kageyama T, Sampurno OD, Nobusawa E, Tashiro M. International collaboration on the characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from humans in Indonesia during 2011-2012 for developing the vaccine candidate viruses. *Options for the Control of Influenza VIII*. Cape Town, South Africa. September 2013.

8) Asanuma H, Ainai A, Nagata N, Kishida N, Takahashi H, Konomi N, Yamaguchi Y-F, Tashiro M. Relationship between virus clearance and induction of nasal IgA after infection of

ferrets with H3N2 influenza virus derived from clinical specimens. International Congress of Mucosal Immunology. Vancouver Canada, July 2013,

9) Ainai A, van Riet E, Tamura S, Suzuki T, Kawaguchi A, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy human adults. 7th Vaccine & ISV. Barcelona, Spain. October 2013

10) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human secretory-IgA on viral neutralization activity in upper respiratory tract. 7th Vaccine & ISV. Barcelona, Spain. October 2013

11) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, van Riet E, Tamura S, Ikeda K, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia 2014. CO, USA. January 2014

12) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia 2014. CO, USA. January 2014

13) Ikeda K, Ito R, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Arai Y, Tashiro M, Asanuma H, Hasegawa H. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone symposia 2014. CO, USA. January 2014

## 2. 国内学会

1) 高下恵美, 小田切孝人. 5 シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス. 第 54 回

日本臨床ウイルス学会. 倉敷. 2013 年 6 月.

2) 今井正樹. 中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)について. 第 47 回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム. 北海道奈井江町. 2013 年 7 月.

3) 高下恵美. 小児における抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの検出. 第 45 回日本小児感染症学会学術集会. 札幌. 2013 年 10 月.

4) 高下恵美, 徐紅, 江島美穂, 藤崎誠一郎, 岸田典子, 今井正樹, 伊東玲子, 菅原裕美, 土井輝子, 佐藤彩, 三浦舞, 田代真人, 小田切孝人. ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつ A(H7N9)および A(H3N2)インフルエンザウイルス. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月.

5) 藤崎誠一郎, 岸田典子, 徐紅, 今井正樹, 高下恵美, 菅原裕美, 土井輝子, 佐藤彩, 伊東玲子, 三浦舞, 江島美穂, 小口晃央, 花巻朝子, 山崎秀司, 藤田信之, 田代真人, 小田切孝人, 全国地方衛生研究所. 2012/13 シーズンのインフルエンザ流行株と 2013/14 シーズンのワクチン株. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月.

6) 中村一哉, 白倉雅之, 武藤亜紀子, 内藤忠相, 藤崎誠一郎, 田代真人, 信澤枝里. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月.

7) 高下恵美. インフルエンザウイルスのファビピラビル (T-705) 感受性. 3rd Negative Strand Virus-Japan. 沖縄. 2014 年 1 月.

8) 大場邦弘, 田中智子, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザおよび RS ウイルス感染症診断の臨床的検討. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2013 年 10 月

9) 林 健太, 加藤昭生, 大場邦弘, 小鍛治雅之, 高橋

仁, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. インフルエンザ A/H3N2 感染を契機に発症した横断性脊髄炎の4歳男児. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013年10月

10) 高山郁代, 中内美名, 高橋仁, 田代真人, 影山努. 鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理方法についての検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

11) 高橋仁, 大西和夫, 西村研吾, 高山郁代, 中内美名, 永田志保, 小林美栄, 横田恭子, 田代真人, 影山努. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

12) 影山努, 高橋仁, 高山郁代, 中内美名, 田代真人, 大場邦弘, 改田 厚, 久保英幸. Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルス同定について. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

13) 中内美名, 高山郁代, 高橋仁, 大場邦弘, 田代真人, 影山努. B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた鑑別検出法の構築. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

14) 小林美栄, 高橋仁, 西村研吾, 高山郁代, 大西和夫, 板村繁之, 影山努, 横田恭子. H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

15) 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 天羽清子, 影山 努. 乳幼児呼吸器感染症からのコロナウイルス検出. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月.

16) 佐藤佳代子, 浅沼秀樹, 高橋宜聖, 阿戸学, 田代真人,

板村繁之. 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状と防御効果との相関. 第17回日本ワクチン学会学術集会. 津. 2013年11月30日-12月1日

17) Sato K, Takahashi Y, Ato M, Asanuma H. TLR agonists induce high avidity of virus-specific antibodies upon a booster conditions. 第42回日本免疫学会学術集会. 幕張. 2013年12月

18) 板村繁之. インフルエンザワクチンの力価試験の変遷と課題. 第27回インフルエンザ研究者交流の会. 札幌. 2013年6月

19) 内田裕子, 彦野弘一, 金平克史, 竹前喜洋, 信澤枝里, 田代真人, 西藤岳彦. 中国の人から分離された H7N9 亜型インフルエンザウイルスの家禽における性状解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

20) 鈴木康司, 谷川太一朗, 内田裕子, 竹前喜洋, 西藤岳彦. 鳥インフルエンザウイルス PB1 蛋白のポリメラーゼ活性に関わるアミノ酸同定と鶏への病原性の影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

21) 原田勇一, 中村一哉, 浜本いつき, 浅沼秀樹, 相内章, 田代真人, 奥野良信, 山本典生. マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

22) 原田勇一, 中村一哉, 浜本いつき, 榎本匡志, 浅沼秀樹, 相内 章, 田代真人, 山本典生. マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析. 第17回日本ワクチン学会学術集会. 津. 2013年11月30日-12月1日

23) 杉村 哲, 高橋 仁, 城内 健太, 大塩 木乃実, 金山 雅也, 田墨 恭子, 谷畑 葉子, 三浦 裕, 藤原 大介, 山本 典生. *L. lactis* JCM5805 株摂取によるプラズマサイトイド樹状細胞活性化を介したウイルス性呼吸器感染症抑制効果の検証. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸.



2013年11月

24) 泉地恭輔、相内 章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、梁 明秀、長谷川秀樹 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

25) 池田千将、伊藤 良、相内 章、鈴木忠樹、田村慎一、荒尾雄二郎、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

26) 相内 章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、原田勇一、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

27) 川口 晶、鈴木忠樹、相内 章、佐藤由子、永田典代、田代真人、長谷川秀樹 Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症かモデルの作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013年11月

28) 長谷川秀樹、相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会. 津. 2013年11月30日-12月1日

29) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会. 津. 2013年11月30日-12月1日

30) 相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会. 津. 2013年11月30日-12月1日

31) Asanuma H. Contribution of virus clearances by nasal IgA in ferrets primed with H3N2 influenza virus derived from clinical specimens. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 幕張. 2013年12月

32) Fujihashi K, Sekine S, Fukuyama Y, Asanuma H, Aso K, Ikeda Y, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR. Nasal pFL and CpG ODN alone enhances immediate, specific recall IgA Ab responses. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 幕張. 2013年12月