

2 1. インフルエンザウイルス研究センター

センター長 小田切 孝人

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対策への支援と緊急対応体制の維持強化、WHO インフルエンザ協力センターとして海外流行株情報の収集機能の強化、アジア地域と連携したサーベイランス網の活性化と技術支援および世界インフルエンザ監視対応体制 (GISRS) の運営にコアメンバーとして参画、WHO および国内ワクチン株の選定、ワクチン製剤の品質管理体制の維持と改善などをめざして、6 室体制 (第一室(ウイルスサーベイランス)、第二室(診断検査、国内外研修)、第三室(ワクチン製剤品質管理、GMP 管理)、第四室(季節性・新型ワクチン製造株の開発)、第五室(細胞培養ワクチン開発)、第六室(経鼻接種ワクチン開発))で業務、研究活動を行っている。

人事異動では、平成 31 年 3 月 31 日付で小田切孝人がセンター長を、板村繁之が第 3 室長を定年退官した。

研究開発業務としては、季節性ワクチン製造株開発のため、国内の医療機関から提供された臨床検体から、鶏卵を用いてウイルス(親株)を分離し、WHO のワクチン製造株開発機関に送付した。提供した親株から開発された高増殖リアソータントウイルスについて、ワクチン製造株候補としての妥当性を評価した。また、パンデミックインフルエンザ対策の一環として、リアルタイム RT-PCR 法を用いた鳥インフルエンザ H9N2 ウイルス検出系を構築、リアルタイム RT-LAMP 法による全自動ポイントオブケア迅速検査法を利用したインフルエンザ、RS およびメタニューモウイルス検出系の構築と臨床的検証に携わり、イムノクロマトキットよりも高い検出感度、従来のリアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度を有している事を確認した。

ワクチンに関する研究としては、ワクチン接種後のヒト血清抗体と流行株との反応性を評価した human serology を毎年継続し、WHO ワクチン株選定に貢献した。4 価ワクチンの力価測定のために、交差反応性ないモノクローナル抗体を採用した測定法を開発し、その有用性を検証した。また、近々

にわが国に導入実用化が予定されている経鼻弱毒生ワクチンの力価測定法の開発を進めた。さらに細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けて、細胞培養ワクチン製造株の開発、細胞培養ワクチン中の HA 抗原量測定法の開発を進めた。次世代ワクチンとして期待されている経鼻粘膜ワクチンの抗体応答の評価法の開発にも取り組んだ。

流行動向調査(サーベイランス)およびレファレンス業務では、地衛研、感染症疫学センターと連携して、国内および周辺諸国から流行株を収集し、それらの抗原性・遺伝子解析、薬剤感受性試験などを実施し、解析結果を地衛研および周辺諸国へ還元した。また感染症疫学センターHP を通じて情報還元した。これらの解析情報をもとに次シーズン向けのワクチン候補株の検索を行い、WHO ワクチン推奨株や海外情報も考慮して平成 30 年度のワクチン株の選定を行った。また、各地衛研に対して、ウイルス分離・培養の精度の改善に向けた実態調査と個別指導を、全国の検疫所に対してインフルエンザウイルス核酸検出検査に関する技術研修と外部精度評価を実施した。前年度に引き続き、インフルエンザワクチン力価測定用の標準試薬(抗原、抗血清)を製造し、国際標準化を行った。それらは、ワクチンの国家検定の参照品として採用された。国内に持ち込まれた携帯品非加熱家禽肉から分離された鳥インフルエンザウイルス(H5 亜型、H7 亜型)およびインドネシア国においてヒトから分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1 亜型)の遺伝子解析及び抗原性解析を行い、WHO インフルエンザワクチン株選定会議資料として提出した。

国際協力関係では、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、周辺諸国と連携したサーベイランス活動を行い、WHO ワクチン推奨株の選定に貢献した。また、WHO の薬剤耐性サーベイランス強化ワーキング会議、PCR 診断技術改良ワーキング会議、ワクチン株を適正に選定するための改良会議等にコアメンバーとして参加し、研究開発情報や国内サーベイランスから得られた情報を提供し、WHO の政策策定にも貢

献し、WHO インフルエンザ協力センターとしての役割を果たした。また、ベトナム、モンゴルに職員をそれぞれ派遣して、現地における感染診断検査やサーベイランスに関する技術指導を行った。

研修、教育に関する業務では、台湾 CDC からは研修職員を受け入れ、遺伝子解析技術研修を実施した。FETP 初期研修および医師卒業研修ではインフルエンザ流行状況やワクチン選定についての講義を行った。また感染研一般公開においては、インフルエンザに関する話題提供と遺伝子検査に関するミニ実験コーナーによる一般者参加型の催しなどを行った。

インフルエンザウイルス研究センターが発足してから9年が経過し、研究開発業務、サーベイランス業務、WHO 協力センターとしての国際貢献、国内新型インフルエンザ対策への貢献、ワクチン品質管理の研究など、広範な研究業務をセンター一丸となって推進し、WHO およびわが国のインフルエンザ行政を支援している。引き続き、センター機能を適切に維持するため、適正な人材の確保と若手研究者の育成に力を入れていきたい。

業績

調査・研究

1. インフルエンザウイルスに関する研究

1. 新規抗インフルエンザ薬パロキサビル耐性変異ウイルスの検出

新規抗インフルエンザ薬パロキサビルは、日本国内において2018年2月に承認され、3月より使用可能となった。国立感染症研究所と全国地方衛生研究所は共同で、2017/18シーズンからパロキサビルに対する耐性株サーベイランスを実施している。2018年12月には横浜市でパロキサビル投与後の小児から、PA I38T 耐性変異をもち、パロキサビルに対する感受性が約80~120倍低下したパロキサビル耐性変異A(H3N2)ウイルスが2株検出された。さらに、全国から収集したA(H3N2)ウイルスの解析により、パロキサビル未投与の小児4名からパロキサビル耐性変異ウイルス4株を検出した。PA I38T 耐性変異はパロキサビル投与に起因すると考えられており、パロキサビル未投与患者から検出された耐性変異ウイルスは、パロキサビル投与患者から感染伝播したと考えられる。日本国内で検出されたパロキサビル耐性変異ウイルスは、ほとんどが12歳未満の小児から分離されている。パロキ

サビル耐性変異ウイルスの発生動向の把握は、公衆衛生上、国内のみならず世界的にも極めて重要であり、引き続きパロキサビル耐性株のサーベイランスを実施し、速やかに情報提供を行っていく必要がある。[高下恵美、森田博子、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、桑原朋子、岸田典子、三浦秀佳、佐藤彩、秋元未来、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、全国の医療機関、保健所、地方衛生研究所]

2. 鶏卵馴化 A/Saitama/103/2014 (H3N2)インフルエンザウイルスの性状解析

近年、H3N2ウイルスを鶏卵で分離・継代すると、鶏卵への馴化によってHAのレセプター結合部位 / 抗原部位に変異が入るため抗原性が変化し、流行株とワクチン株の抗原性が乖離する現象が起きている。

我々が分離した A/Saitama/103/2014 (H3N2)株(埼玉株)は、鶏卵で継代を重ねてもHAのレセプター結合部位 / 抗原部位には変異が入らず、流行株と類似の抗原性を保持していた。このウイルスの限界希釈を行い、単一のクローンの分離を試みたところ、NAに2ヶ所の変異を持つウイルス(C3E8-m2)と7ヶ所に変異を持つウイルス(C3E8-m7)の2種類が分離された。一般的に鶏卵馴化株のHAのレセプター結合部位 / 抗原部位への変異は、HAが鶏卵のレセプターへ結合しやすくするために誘導されるが、鶏卵馴化埼玉株は、HAではなくNAに多数の変異が誘導されたことから、NAが鶏卵のレセプターへの結合に関与したと考えられた。そこで我々は、鶏卵馴化埼玉株のNAに誘導された変異の意義を明らかにするため、C3E8-m2とC3E8-m7のNAの性状解析を試みた。まず、C3E8-m2とC3E8-m7のNAをそれぞれCos-7細胞に発現させ、赤血球吸着反応によりシアル酸レセプターに結合するかどうかを調べた。その結果、C3E8-m2とC3E8-m7のNAを発現している細胞は赤血球を効率良く吸着した。そのため、鶏卵馴化埼玉株はNAを介してレセプターに結合に関与することが示唆された。また、C3E8-m2 NAの変異を野生型に1つずつ戻し赤血球の吸着を調べたところ、NAの赤血球結合能にはそのうちの1つの変異が不可欠であることを発見した。さらに、レセプター結合能を弱めたHAとC3E8-m2 NAまたはC3E8-m7 NAを持つウイルスを作出し、鶏卵における増殖を調べたところ、両ウイルスとも鶏卵で増殖した。したがって、埼玉株はNAによるレセプター結合により鶏卵で増殖できることが明らかになった。

[桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤佳代子、秋元未来、小川理恵、佐藤 彩、三浦秀佳、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人]

3. rhPCR 法を用いた PA 蛋白質 I38T バロキサビルマルボキシ耐性株の検出系の構築

A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型インフルエンザウイルスは、PA 蛋白質の 38 番目のアミノ酸がイノシン(I)からトレオニン(T)に変異(113 番目の塩基が T から C に置換)するとバロキサビルマルボキシ(商品名ゾフルーザ)に対して耐性を示す。この変異をもつウイルスを迅速に検出するために、ウイルス RNA を逆転写した cDNA を鋳型とし、RNase H2 assay 技術を用いた rhPCR 法による検出法を構築した。[中内美名、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、齊藤慎二、高山郁代、小川理恵、森田博子、三浦秀佳、永田志保、小田切孝人、影山努]

4. インフルエンザ、RS およびメタニューモウイルスを全自動で検出可能なポイントオブケア検査法の有用性の検討

近年、核酸検査法の医療現場への導入が進んでいるが高価な設備や熟練した技術が必要なため、普及は難しい。今回、検体の処理から real-time RT-LAMP 法による検出までを全自動で実施し、4 種類の呼吸器感染症ウイルス(A 型及び B 型インフルエンザウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス)を 30 分以内に検出可能なポイントオブケア(POC)迅速検査法を開発し、2018/19 シーズンの臨床検体を用いて、感度や特異性を real-time PCR 法やイムノクロマトキットと比較検討した。

結果、インフルエンザおよび RS ウイルスでは本 POC 検査法は PCR 法の結果と高い一致率を示し、イムノクロマトキットよりも検出感度は明らかに優れていた。本 POC 検査法は、検体由来の非特異反応も見られず、迅速かつ簡便な核酸検査法であることが示された。

[齊藤 慎二;仙波晶平、横野航太(栄研化学株式会社)、高山郁代、中内美名;久保英幸、改田厚(大阪健康安全基盤研究所)、塩見正司(愛染橋病院)、村上貴孝(中野子ども病院)、木屋啓一(西東京中央総合病院)、大場邦弘(公立昭和病院)、浅井定三郎(あさい子どもクリニック)、影山努]

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

ワクチン接種者血清の抗体保有率、陽転率、および流行株との交差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、2018/19 シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種をうけた成人層および老人層のそれぞれペア血清検体を用いて、ワクチン製造株および流行株に対する反応性を評価した。評価に際し、国内ワクチン接種後血清試料のうち、赤血球凝集抑制(HI)試験により、ワクチン抗原である B/Meryland/15/16 (ビクトリア系統)または B/Phuket/3073/13(山形系統)株のいずれかに対する抗体価が 40HI 価以上のものを成人層、老人層からそれぞれ 24 検体抽出し、試験に用いた。ワクチン接種者血清は、A(H1N1)pdm 流行株と B 型山形系統流行株に対して若干低い反応性を示した。B 型ビクトリア系統については、ワクチン株と同じ遺伝子グループの 1A.1 に属する野外流行株とよく反応したが、前シーズンの 1A に属する株とは低い反応性を示した。A(H3N2)株に対する抗体価の評価は HI 試験で実施することが困難である近年の状況を踏まえ、中和試験による評価を行った。ワクチン抗原に対する相同抗体価は高値を示し、ワクチン抗原の免疫原性は相応に高いことが推察されたが、A(H3N2)野外流行株との反応性は乏しく、高いワクチン効果は見込めないと考えられた。以上から、B ビクトリア系統の 1A.1 に属する流行株に対してはワクチンの効果が期待されるが、それ以外の A(H1N1)pdm09 流行株、B ビクトリア系統の 1A に属する流行株及び B 山形系統流行株に対してはワクチン効果の減弱が懸念された。また、米国と英国から入手したワクチン接種後ヒト血清についても同様の評価を行ったところ、米国のワクチン接種者血清の抗体 GMT は、ワクチン接種後に高い上昇倍率を示したのに対して、日本のワクチン接種者血清のその上昇倍率は極めて低かった。これは今回の試験結果に限られたことではなく毎年見られる結果であり、ワクチン効果増強のためには日本のワクチンの低い免疫原性を改善することが必須であると言える。これらの成績を WHO インフルエンザ協力センター間で共有し、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の議論に際し、有用な資料として活用された。[岸田典子、中村一哉、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、高下恵美、桑原朋子、小川理恵、森田博子;菅蒲川由郷、齋藤玲子(新潟大学国際感染医学講座)、渡邊

真治、小田切孝人]

2. IgA 四量体作製法の開発と四量体化させた抗インフルエンザ広域中和抗体の特性解析

ヒト呼吸器粘膜上には、抗ウイルス活性を持つ分泌型 IgA 抗体(SIgA)が誘導されており、SIgA は二量体や四量体などいくつかの四次構造を取ることが知られているが、その病原体不活化機構への影響は不明であった。モノクローナル四量体分泌型 IgA 抗体(tSIgA)を作製する技術を開発し、同一の抗原認識部位を有する IgG 抗体及び単量体、二量体と四量体の IgA 抗体の抗インフルエンザウイルス広域中和抗体を作製し、抗ウイルス活性を比較した。

IgA 抗体の四量体化により抗ウイルス活性の最大活性は変化せず、標的域が拡大することを明らかにした。IgA 抗体の四量体化が、抗ウイルス活性の標的域を広げ交叉反応性を高めることに寄与していることを直接的に証明したものであり、経鼻インフルエンザワクチンに特有のワクチン作用機序の一端を明らかにするものである。[齊藤慎二;佐野 芳、鈴木忠樹、相内章(感染病理部)、多賀祐喜、上野智規(株式会社ニッピ)、田畑耕史郎、齋藤訓平、和田雄治、大原有樹(感染病理部)、小田切孝人、影山努、後藤希代子(株式会社ニッピ)、長谷川秀樹(感染病理部)]

3. ワクチン力価新規試験法の開発

昨年度までに、新規検出法の指標探索として、マウスの中和抗体誘導に関する免疫原性が異なった AH3N2 の 2 株のスプリットワクチンを対象に、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC-HPLC)法によってワクチンの粒径分布を解析したところ、定量的に精度よく検出でき、株間の粒径分布差即ちスプリット化の程度が異なることが判った。一方で、ワクチン力価は、これまで一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法によって測定されてきたが、平成 27 年度から国内導入された4価ワクチンで生じた、B 型ウイルス2株間の SRD 試験上交差反応の影響で正確な力価測定が困難或いは測定不能になった問題を解決するため、交差反応が生じない B 型系統特異的モノクローナル抗体を使用した B 型抗原定量 ELISA 法による力価測定法を開発したものの、ELISA 標品に SRD 試薬を用いた場合、株によっては SRD 試験法での力価と乖離が生じるという新たな課題が見つかった。そこで、この SEC-HPLC 技術を応用して、ELISA 法と SRD 法との間で、ワクチン力価に最も測

定乖離が出た株に関して、SRD 試験での SRD 標準抗原とスプリットワクチンの可溶化分散状態を再現し、性状解析を行った結果、標準抗原では凝集体が見られたため、可溶化状態がワクチンに近い高純度精製ヘマグルチニン蛋白を ELISA 標品としたところ、測定乖離が改善出来た。このように、新規試験法として開発した ELISA 法に、従来の力価試験法である SRD 法との一致性を維持するには、適切な標品の制定および規格化が必要であり、品質管理試験上の重要性が認識出来た。[嶋崎典子、板村繁之]

4. 弱毒生インフルエンザワクチンの力価測定法の開発

弱毒生ワクチンのウイルス感染力価測定には、感染細胞を蛍光染色し、検鏡下で感染細胞数を直接計数する蛍光フォーカスアッセイ法を用いるが、細胞数計測の測定者間差異を克服するため、画像解析による計数の自動化を試みている。擬似的に蛍光検出の感度を高めるとともに、測定に用いる計数量を増加させる手法が一部の検体で有効であることが明らかとなった。ウイルス株の差異や、繰り返し試験での手法の安定性について引き続き検討中である。[原田勇一、板村繁之]

5. インフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答に関する研究

インフルエンザワクチンにはウイルス粒子をホルムアルデヒドで固定した全粒子ワクチンとウイルス粒子をさらにエーテルで処理し脂質膜を除去し部分的に HA 成分を精製した HA ワクチンがある。これまでに全粒子ワクチンと HA ワクチンにより産生誘導される抗体に質的違いがあることを明らかにしてきたが、これらの評価は二回免疫後の抗血清を評価したものであった。そこで抗体誘導のメカニズムを詳細に解明するために初回免疫に焦点を当てた検討を行った。全粒子ワクチンで初回免疫、HA ワクチンで追加免疫を行うと HA ワクチンを二回免疫した場合に比べて avidity の高い抗体が産生誘導され、ADCC 抗体の産生も誘導された。一方、追加免疫のみ全粒子ワクチンを用いた場合には avidity の増強は認められるものの ADCC 抗体は産生誘導されなかった。したがって、インフルエンザワクチンは初回免疫と追加免疫で異なる機構により抗体産生を誘導している可能性が示された。[佐藤佳代子、浅沼秀樹、板村繁之]

6. 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けての取り組み

日本の季節性インフルエンザワクチン製造に細胞培養法を導入することが可能であるのかを検討するために、昨年度に引き続き下記課題への取り組みを行った。〔(1)細胞培養ワクチン株の開発、(2)細胞培養ワクチンの品質評価法の開発。〕課題(1):今年度も感染研所有のNIID-MDCK細胞を用いて2017/18シーズンの臨床検体から分離したウイルス(元株)をワクチン製造所へ分与し、ワクチン株開発に供した。各ワクチン製造所社により、進捗が異なるが、昨年度までに分与した元株に由来するワクチン製造候補株に対して、当室で抗原解析試験を行い、WHOが推奨する当該シーズンの抗原的基準株との抗原的同等性につき評価を行った(詳細は別記)。今後、これまでに分与した元株から開発された全ての候補株に関して抗原解析試験を行い、ワクチン株開発に関わる今後の課題を明らかにする。課題(2):課題(1)で開発された一部のワクチン株をもとに一元放射免疫拡散(SRD)試験試薬を作製し、SRD試験を行った(詳細は別記)。引き続き、上記製造所の4価ワクチンや他社の試作ワクチンに対して試験を行い、細胞培養季節性ワクチン実用化のための課題を明らかにしていく。〔信澤枝里、高橋仁、浜本いつき、小田切孝人、ワクチン製造所(KMバイオロジクス、北里第一三共、武田薬品工業、阪大微研会)〕

7. 細胞培養ワクチン株の開発

NIID-MDCK細胞を用いて各インフルエンザシーズン(2014/2015、2015/2016)に採取された臨床検体から分離したウイルス(元株)をワクチン製造所へ分与し、A/H3N2亜型とB/ビクトリア系統のワクチン候補株の作製を行った。これら候補株の多くが、WHO推奨抗原的基準株と同等の抗原性を示し、細胞培養ワクチン株として資するものであることを確認した。また、作製したワクチン株の抗原性を市中流行株と比較した結果、H3N2以外では抗原性の一致が確認されたが、H3N2は中和試験方法の違いで結果が触れる傾向が見られたため、妥当な試験法の確立を試みている。〔信澤枝里、高橋仁、浜本いつき、小田切孝人、ワクチン製造所(北里第一三共、阪大微研会)〕

8. 細胞培養ワクチンの品質評価法の開発

細胞培養ワクチンのHA抗原量測定のための一元放射免

疫拡散(SRD)試験用試薬の作製と、その試薬を用いたHA抗原量の測定を行った。2014/15シーズンの臨床検体に由来するワクチン株から作製された単価および4価ワクチンのSRD試験を行った結果、両ワクチン中の各HA抗原量はほぼ等しい値を示した。また、SRD試薬のうちヒツジ抗血清の共有化の可能性を検討するため、2社の異なるワクチン株HAに対する各抗血清を用いて、1社のワクチンのHA抗原量の測定を行った結果、HA抗原量は現行の検定基準の許容範囲の値を示し、SRD試薬の共有化が可能であることが示唆された。〔高橋仁、浜本いつき、小田切孝人、信澤枝里、ワクチン製造所(武田薬品工業、阪大微研会)〕

9. インフルエンザウイルス存在下におけるパラインフルエンザウイルス3型に対するNIID-MDCK細胞の感受性評価

昨年度は、NIID-MDCK細胞においてA型とB型インフルエンザウイルス存在下ではHPIV3に対する感受性に差異があることを示した。本年度は、B型インフルエンザウイルスとHPIV3のゲノム量比及び両者の感染時間差によるHPIV3に対するNIID-MDCK細胞の感受性評価を行った。その結果、共感染させるB型インフルエンザウイルスのゲノム量や感染時期がHPIV3に対する感受性に影響することが示された。〔浜本いつき、高橋仁;水田克巳(山形県衛生研究所)、小田切孝人、信澤枝里〕

10. ウイルス様粒子(VLP)を用いた新規経鼻インフルエンザワクチン開発に関する研究

現行のインフルエンザワクチンは主に以下の問題を抱えている。

- ・製造過程でのワクチン抗原の変異
- ・鶏卵の使用による製造量の制約と迷入因子の混入
- ・流行株変異による有効性の低下
- ・ウイルス侵入門戸の分泌型IgA誘導不能

このような問題点を解消するためにウイルス様粒子型(VLP)経鼻インフルエンザワクチンの開発を行っている。昨年度までにA/California/7/2009(A(H1N1)pdm09)株のHA遺伝子を用いたVLP(Cal7 HA-VLP)を経粘膜アジュバントのCpG-ODN G9.1(G9.1)とともにマウスに経鼻投与した場合の免疫応答ならびに防御効果を検討し、Cal7 HA-VLPは現行のスプリットワクチン(X-179A)よりも免疫原性が高いこと、ならびにG9.1は粘膜経由で高い免疫増強効果を有すること、

さらには他の粘膜アジュバントよりも炎症性サイトカインの誘導が低いことが明らかとなった。引き続き、G9.1 併用経鼻ワクチンによる交叉防御能を検討するため、野外株からチャレンジウイルスに適した株を確立することを目指した。特に近年のA/H3N2株はマウスに対する感染性が著しく減弱しており、マウスに野外株を感染させても気道での増殖がほとんど認められない。そこで、2012-13 シーズンに分離された A/H3N2 亜型の野外株 12 株をマウスに感染させ、3 日後に鼻腔洗浄液を回収してウイルス価を測定した。その結果、2 株でウイルスの検出が認められた。続いてこの鼻腔洗浄液を用いてウイルス単離を行い回収されたウイルスクローンのマウスでの感染性を検討した結果、上気道では増殖するが、下気道では増殖しない株が回収できた。現在、本株の性状解析を進めており、引き続き感染株としての有用性を検討する。[浅沼秀樹、小田切孝人; 氏家誠(日本獣医生命科学大学)、藤橋浩太郎(東大・医科研)]

11. ヒト粘膜抗体の測定方法の樹立に関する研究

経鼻インフルエンザワクチン開発の一環として、気道抗体の評価方法の構築を目指した検討を進めている。前年度までに抗体応答を測定するための唾液はワルトン管の分泌部位から採取すると高濃度、かつ夾雑物が少ない分泌型 IgA 抗体 (SIgA) が回収できることを示した。一方、鼻腔洗浄液中に分泌される SIgA については、防御効果との相関性を示すことが困難であったため、インフルエンザに感染したヒトの鼻腔洗浄液中で中和能を検討するためのモデル実験として、感染マウスの鼻腔洗浄液を用いた plaque reduction 法を検討した。その結果、マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、高い抗体応答が認められた鼻腔洗浄液であれば、鼻腔洗浄液を濃縮せずにプラークの減少能が認められることが明らかとなった。既に感染から回復したヒトの鼻腔洗浄液を数検体有しているため、引き続きこれらの検体の抗体価と plaque reduction 法の検討を進めていく。[浅沼秀樹; 黒野祐一、大堀純一郎(鹿児島大学・医)、藤橋浩太郎(東大・医科研)、小田切孝人]

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 ビクトリア系統、B 山形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。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、森田博子、渡邊真治、小田切孝人]

2. フェレット感染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(細胞株)、B 山形系統(細胞株)、B ビクトリア系統(細胞株)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(台湾、韓国、ミャンマー、モンゴル、ラオス)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。[岸田典子、中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、桑原朋子、高下恵美、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、森田博子、渡邊真治、小田切孝人]

3. 地方衛生研究所における抗インフルエンザ薬耐性検査の実態調査

A(H1N1)pdm09 ウイルスを対象に実施している H275Y 耐性マーカーの検出検査は、A(H1N1)pdm09 の流行状況によりシーズン毎の解析数が大きく変動する。そのため、流行の規模が小さいシーズンには、検査を行う機会がまったく無い場合がある。そこで、シーズン毎に検査の実態調査を行い、調査結果を検査精度の維持・向上に資することを目的として、本年度は全国 43 カ所の地方衛生研究所を対象に、新たに合成した RNA 陽性コントロールについて TaqMan RT-PCR 法により検出を行った。その結果、全ての地衛研で検査精度が維持されていることが確認された。[高下恵美、中内美名、岸田典子、中村一哉、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、小川理恵、森田博子、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、全国地方衛生研究所]

4. 地方衛生研究所におけるウイルス分離培養および亜型同定技術実態調査

インフルエンザウイルス株サーベイランスの質的・量的向上をはかるうえで、地方衛生研究所におけるインフルエンザウイルスの分離培養および亜型同定技術の精度維持は肝要である。全国地方衛生研究所における当該技術の状況を把握することを目的に、本年度は東北・北海道および近畿ブロックの地方衛生研究所を主として37箇所を対象に、ウイルス分離培養および亜型同定技術の実態調査を実施した。調査参加地方衛生研究所に、ウイルス分離試用試料としてA(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 山形系統、B ビクトリア系統、および陰性検体を含む5サンプルを配布し、通常使用している培養細胞および手法を用いて、ウイルス分離および型・亜型同定を行ってもらった。分離成否や分離ウイルスの亜型同定試験結果について回答を集めるとともに、アンケートを通じて各地方衛生研究所での具体的手法の確認や作業に関する疑問点の収集に努めた。調査参加地衛研各所で当該技術は概ね良好に維持されており、野外株分離収集業務に十分能うものと考えられた。分離および同定結果に疑義が認められた場合には、適宜担当者との相談を行い、改善策の提示を行うことで、各所での野外株分離技術向上に寄与した。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、森田博子、渡邊真治、小田切孝人、全国地方衛生研究所]

5. インフルエンザ診断マニュアルの改訂

平成26年にインフルエンザ診断マニュアルの改訂を全国の地方衛生研究所と感染研の共同作業行により行ったが、その後の検査技術の進歩を踏まえ、また、近年の流行株の性状にあわせて一部内容を更新した。今回の改訂では、地衛研への次世代シーケンス技術の浸透を鑑み、次世代シーケンス手法について記載、およびプライマーリストを更新した。また抗インフルエンザ薬としてパロキサビルマルボキシルが承認され、その使用頻度の高さから、標的遺伝子であるPA 遺伝子のシーケンス解析による耐性株検出法を記載した。診断法については、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遺伝子検出系のプローブ配列を変更した。改訂したインフルエンザ診断マニュアル(第4版)は、

平成30年12月に感染研のHP上に公開された。

[中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、岸田典子、桑原朋子、渡邊真治、中内美名、高山郁代、齊藤慎二、影山努、小田切孝人;長野秀樹(北海道立衛生研究所)、高橋雅輝(岩手県環境保健研究センター)、新開敬行(東京都健康安全研究センター)、川上千春(横浜衛生研究所)、米田哲也(富山県衛生研究所)、森川佐依子、岡山文香(大阪健康安全基盤研究所)、豊嶋千俊(愛媛県立衛生環境研究所)、芦塚由紀(福岡県保健環境研究所)、久場由真仁(沖縄県衛生環境研究所)、安井善宏、皆川洋子(愛知県衛生研究所)]

6. 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/North Carolina/04/2016 (H3N2)-cell derived [CBER]、B/Iowa/06/2017-cell derived [CBER]、B/Maryland/15/2016 [NIBSC]、B/Maryland/15/2016 [TGA]、B/Singapore/INFTT-16-0610/2016-cell derived [CBER]、B/Maryland/15/2016 (BX-69A) [CBER]、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186) (H3N2) [CBER]、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186) (H3N2) [NIBSC]、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186) (H3N2) [TGA]、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (NIB-104) (H3N2) [CBER]、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (NIB-104) (H3N2) [NIBSC]、A/Guangdong/17SF003/2016 (NIBRG-375) (H7N9) [CBER]、IDCDC-RG56N (A(H7N9)) [CBER]、B/Colorado/06/2017 [TGA]、A/Switzerland/8060/2017 (NIB-112) (H3N2) [NIBSC]、A/Brisbane/1/2018 (NYMC X-311) (H3N2) [NIBSC]、A/Brisbane/1/2018 (NYMC X-311) (H3N2) [TGA]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。[原田勇一、仲山紀子、佐藤佳代子、板村繁之、嶋崎典子、小田切孝人]

7. 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 30 年度のインフルエンザ HA ワクチンのワクチン製造株である A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1pdm09)、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(IVR-186)(H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Maryland/15/2016(BX-69A)の 4 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。また、B 型ウイルスの 2 株については、昨年度に引き続いて、SRD 試験方法の評価研究結果に基づき、SRD 試験の実施区分を制定した。[嶋崎典子、原田勇一、板村繁之、仲山紀子、佐藤佳代子、小田切孝人]

8. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための参照インフルエンザ HA ワクチンの作製

国家検定の力価試験として一元放射免疫拡散(SRD)試験あるいは卵中和試験を行うこととされているが、通常は SRD 試験が力価試験として実施されている。SRD 試験で HA 含量が規定されたワクチンのマウスにおける免疫原性を確認することを主な目的として、卵中和試験に使用するウイルス株ごとに 15µg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを作製している。本年度の参照ワクチンとして、平成 30 年度のワクチン製造株である A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1pdm09)、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(IVR-186)(H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Maryland/15/2016(BX-69A)の 4 株のワクチンを含有するものを作製した。参照ワクチンの作製に使用する原液について HA 価測定及び分画試験を実施して原液の品質規格を確認した。また、SRD 試験によって原液の HA 含量を測定して、ウイルス株ごとに 15µg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを調製した。得られた参照ワクチンについて、たん白質含量試験、マウス白血球数減少試験を実施して規格に適合していることを確認し、卵中和試験によってその力価を測定した。[佐藤佳代子、嶋崎典子、原田勇一、仲山紀子、板村繁之；谷生道一、楠英樹、浜口功(血液・安全性研究部)、持田恵子、蒲地一成、柴山恵吾(細菌第二部)、小田切孝人]

9. 標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)の作製

標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)は毎年新規ロットを作製しているが、保存原液の力価が規格を逸脱したため年度内に新規ロット作製が困難となった。そのため、平成 27 年 11 月 6 日及び平成 28 年 12 月 13 日製造の標準ワクチンをワクチン製造所 4 所社と共同で再測定し、標準ワクチンの CCA 価が測定誤差の範囲内と判断し、安定性を確認したので、平成 29 年 10 月 26 日に製造した標準ワクチンを臨時的措置として使用期限を 35 ヶ月に延長した。[佐藤佳代子、仲山紀子、鈴木康司、板村繁之、小田切孝人]

サーベイランス業務

1. 2018/19 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

全国の医療機関、保健所および地衛研の協力のもとに A(H1N1)pdm09:372 株、A(H3N2):375 株、Bビクトリア系統:152 株、B 山形系統:24 株について抗原性解析を行った。2018/19 シーズンの前半は、A(H1N1)pdm09 ウイルスが主流であったが、後半は、A(H3N2)ウイルスが大きく増加して A(H1N1)pdm09 ウイルスを上回った。B 型の流行は極めて小さかった。B ビクトリア系統と B 山形系統の比率は約 9:1 であった。抗原性解析では、解析した A(H1N1)pdm09 分離株の 9 割以上が、WHO ワクチン推奨株 A/Michigan/45/2015 の細胞分離株と類似していた。A(H3N2)は解析株の 9 割以上が今シーズンのワクチン株 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 の細胞分離株(サブクレード 3C.2a1)と類似していた。B ビクトリア系統のクレード 1A.1(2 アミノ酸欠損)に属するウイルスは、2018/19 シーズンのビクトリア系統 WHO ワクチン推奨株 B/Colorado/06/2017 に対する血清とよく反応したが、欠損を持たない流行株および 3 アミノ酸欠損流行株はこの血清に対する反応性が低い傾向にあった。B 山形系統の流行株は、そのほとんどが 2018/19 シーズンの山形系統ワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の細胞分離株に抗原性が類似していた。これら流行株の抗原性解析結果をまとめた情報を感染症疫学センターの IASR ウェブサイトにて開示した。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、小川理恵、三浦秀佳、森田博子、渡邊真治、小田切孝人、全国の医療機関、保健所、地方衛生研究所]

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

東南アジアおよび近隣諸国 WHO ナショナルインフルエンザセンターから356株(ラオス150株、ミャンマー116株、ネパール49株、台湾18株、韓国13株、モンゴル10株)の分離株を入手し、抗原性解析を行なった。A(H1N1)pdm09流行株は、WHO ワクチン推奨株 A/Michigan/45/2015 の類似株が主流を占めた。A(H3N2)解析株はワクチン株 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 の細胞分離株(サブクレード 3C.2a1)の類似株が主流を占めた。B ビクトリア系統のクレード 1A.1(2アミノ酸欠損)に属するウイルスは、2018/19シーズンの B ビクトリア系統 WHO ワクチン推奨株 B/Colorado/06/2017 に対する血清とよく反応したが、欠損を持たない流行株および3アミノ酸欠損流行株はこの血清に対する反応性は低い傾向にあった。B 山形系統分離株はワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の抗原性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、WHO 世界インフルエンザ監視対応システムにおける当該諸国と感染研の連携強化や WHO インフルエンザワクチン株選定会議での議論に際して活用された。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、高下恵美、小川理恵、森田博子、渡邊真治、小田切孝人]

3. A(H3N2)分離株の抗原性解析手法の改良

近年のA(H3N2)株はHA蛋白質による赤血球凝集活性が極めて弱く、HI試験による分離株抗原性解析が行えない状況であるため、中和試験法を代替手法とした分離株抗原性解析が行われている。中和試験を基本原理として派生した感染細胞巣減数試験(Focus reduction assay, FRA)について、オセルタミビルを用いて変異NAによるウイルス感染性増強効果を抑えることで、HAの抗原性評価の精度改善を見込める改良手法を樹立した。本改良手法によって2018/19シーズンのA(H3N2)分離株の抗原性について必要十分な解析を行い、得られた結果をWHOおよび国内向けワクチン株選定会議へ提供、活用された。[中村一哉、岸田典子、秋元未来、佐藤彩、桑原朋子、渡邊真治、小田切孝人]

4. 2018/19シーズンのヒト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。全国の医療機関、保健所および地衛研の協力のもとに、本シーズンはA(H1N1)pdm09亜型371株、A(H3N2)亜型375株、B型ビクトリア系統149株、B型山形系統23株についてHA及びNA遺伝子の系統樹解析を行った。A(H1N1)pdm09亜型は全ての株がサブクレード6B.1(S84N, S162N, I216T)内の6B.1A(S74R, I295V, S164T)に属した。さらに、ほとんどの解析株は成熟HAのアミノ酸の183番目に変異をもち、さらに複数の群(183P-1~183P-7)に分岐した。A(H3N2)亜型は、全てクレード3C.2a(L3I, N144S, F159Y, K160T, N225D, Q311H, D489N)に属した。また遺伝子の多様化が進み、3C.2a内で複数の群を形成した。多くは、それらの群の中で3C.2a1(N121K, N171K, I406V, G484E)または3C.2a2(T131K, R142K, R261Q)に属した。3C.2a1は3C.2a1a(T135K, G479E)と3C.2a1b(K92R, H311Q)に分岐し、3C.2a1bではさらに3C.2a1b+135N群、3C.2a1b+135K群、3C.2a1b+131K群が派生した。欧米で報告数が急増した3C.3aに属するウイルスは、国内では検出されていない。B型ビクトリア系統は全てクレード1A(N75K, N165K, S172P)に属した。このクレードは3つの群に分岐した。すなわち、HAに欠損を持たない群(これまでのクレード1A)、HAに2アミノ酸欠損を持つ群(成熟型HAの162および163番目のアミノ酸欠損;クレード1A.1)、または3アミノ酸欠損を持つ群(162~164番目のアミノ酸欠損)に分岐した。山形系統は全てクレード3(S150I, N165Y, N202S, S229D)内のL172Q, M251Vに属した。データベース充実化のために、上述した株のうち23%については全セグメントの遺伝子解析を実施した。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へ登録した。また、作成した系統樹を感染症疫学センターのIASRウェブサイトに掲載した。[藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、岸田典子、中村一哉、高下恵美、桑原朋子、森田博子、佐藤彩、小川理恵、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人、全国の医療機関、保健所、地方衛生研究所]

5. 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

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。2018/19シ

ーズンには、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル、アマンタジンならびに新規薬剤バロキサビルの6薬剤を対象として、国内外の A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型分離株の薬剤感受性を解析した。その結果、日本国内では、NA 蛋白質に H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が A(H1N1)pdm09 で 0.8% (17/2,073 株) 検出された。また PA 蛋白質に I38 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異株が A(H1N1)pdm09 で 1.5% (5/325 株)、A(H3N2) で 9.4% (32/341 株) 検出された。耐性株はいずれも散发例で、地域への感染拡大は認められなかった。M2 蛋白質に S31N 耐性変異をもつアマンタジン耐性株の検出率は A(H1N1)pdm09 と A(H3N2) で共に 100% (188/188 株、155/155 株) であった。海外株では、耐性株は検出されなかった。日本国内の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。[高下恵美、小川理恵、森田博子、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、全国の医療機関、保健所、地方衛生研究所]

6. 2017/18 シーズンに国内において家きんおよび野鳥から分離された H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析及び抗原性解析

2017/18 シーズンは、国内では島根県、東京都、香川県及び兵庫県において H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出報告があった。島根県ではコブハクチョウ、東京都ではオオタカ、香川県では家禽、兵庫県ではカラスからウイルスが分離され、これらの分離株を受入れ、遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。遺伝子解析については、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。遺伝子解析の結果、HA 遺伝子は、H5 HA クレード 2.3.4.4 (subgroup b) に属した。香川県の株は、他の分離株と比較して、HA 遺伝子系統樹上、少し離れたグループに属し、2017/18 シーズンに韓国において分離された株と近縁であった。抗原性解析の結果から、当センターで所有している同クレードに属するワクチン製造候補株である NIID-001 株に対するフェレット抗血清にこれらの株は良く反応した。また、島根県コブハク

チョウ分離株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した。その結果、上記の分離株には良く反応したが、他の subgroup に属する株には反応しなかった。これらの解析結果は、WHO インフルエンザワクチン株選定会議において資料として活用された。

[有田知子、鈴木康司、高山郁代、白倉雅之、浅沼秀樹、岸田典子; 内田裕子、西藤岳彦(動物衛生研究所)、伊藤壽啓(鳥取大学)、渡邊真治、小田切孝人]

7. 携帯品非加熱家きん肉から分離された H5、H7 型鳥インフルエンザウイルスの性状解析

農林水産省動物検疫所では、2015 年度より海外から携帯品として持ち込まれた未加熱家きん肉等の鳥インフルエンザウイルス汚染状況調査を実施している。そこで、当センターでは、これらの分離された鳥インフルエンザウイルス株の提供を受け、解析を実施した。今年度は、H5N1 亜型:2 株、H7N9 亜型:3 株、H7N3 亜型:1 株の分離株について遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。

1) H5N1 亜型 (AQ-HE79 株、AQ-HE29-79 株): AQ-HE79 株は中国で搭載された鶏肉から、AQ-HE29-79 株は台湾で搭載されたアヒル肉から分離された。AQ-HE79 株はクレード 2.3.2.1d、AQ-HE29-79 株はクレード 2.3.2.1c に属した。近縁のクレードに属するワクチン製造候補株である NIBRG-301 株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した。その結果、AQ-HE79 株に対しては多少反応したが、AQ-HE29-79 株に対しては、あまり反応しなかった。さらに、AQ-HE29-79 株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した結果、AQ-HE79 株には良く反応したが、NIBRG-301 株及びクレード 2.3.2.1 の他の group に属するレファレンス抗原にはあまり反応しなかった。

2) H7N9 亜型 (AQ-HE28-3 株、AQ-HE29-22 株、AQ-HE29-52 株) 及び H7N3 亜型 (AQ-HE30-1 株): すべての株は、中国で搭載されたアヒル肉から分離された。遺伝子解析の結果、AQ-HE28-3 株は、低病原性であり Yangtze River delta (YRD) 系統、AQ-HE29-22 株及び AQ-HE29-52 株については、YRD 系統の高病原性株であった。また、H7N3 ウイルスの AQ-HE30-1 株についても YRD 系統の高病原性株であった。さらに AQ-HE30-1 株については、中国において分離報告されている HxN3 株の NA 遺伝子を有し、複数の株の遺伝子再集合(リアソータント)によって生じたウイル

スであることが分かった。H7N9 リファレンス株である A/Guangdong/17SF003/2016 株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した。ワクチン製造候補株である IDCDC-RG56N 株及び A/Guangdong/17SF003/2016 株に対する抗血清は、AQ-HE28-3 株、AQ-HE29-22 株及び AQ-HE29-52 株については、良く反応したが、AQ-HE30-1 株については抗原性が多少異なった。そこで、AQ-HE30-1 株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した結果、本抗血清は、低病原性株 (AQ-HE28-3 株) また高病原性株 (AQ-HE29-22 株、AQ-HE29-52 株) に対しても良く反応した。

これらの解析を実施することは、中国及び近隣諸国における発生株の性状を把握する上で非常に有益であると考えられる。これらの解析結果は、WHO インフルエンザワクチン株選定会議における資料として活用された。

[有田知子、鈴木康司、高山郁代、白倉雅之、浅沼秀樹、岸田典子; 柴田明弘、尾坂優之 (動物検疫所海外病検査課)、影山努、渡邊真治、小田切孝人]

8. インドネシア国においてヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析及び抗原性解析

インドネシア国において 2017 年 9 月にヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスがインドネシア NIHRD から分与された。本株は、インドネシア・バリ州・ペニダ島において 4 歳男子から採取された検体から分離された株である。遺伝子解析の結果、クレード 2.3.2.1e に属した。現時点において、クレード 2.3.2.1e に属するワクチン製造候補株は作製されていないため、クレード 2.3.2.1a または 2.3.2.1b に属するワクチン製造候補株 (SJ007 株、SJ003 株)、2.3.2.1c に属するワクチン製造候補株である NIBRG-301 株、及びクレード 2.3.2.1c のレファレンス抗血清である A/duck/Japan/AQ-HE29-79/2017 株に対するフェレット抗血清を用いて HI 試験を実施した。その結果、これらのクレード 2.3.2.1 の株に対する抗血清に対して本ウイルス株は反応が悪く、抗原性が異なることが分かった。さらに、本株に対するフェレット抗血清を作製し、HI 試験を実施した結果、他のクレード 2.3.2.1 に属するレファレンス抗原に対して反応しなかった。これらの解析データは、ウイルス株提供国であるインドネシア国へ還元された。

[有田知子、鈴木康司、高山郁代、白倉雅之、浅沼秀樹、岸田典子; Vivi Setiawaty (NIHRD, Indonesia)、渡邊真治、小田切孝人]

9. 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相関していることから、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 H5N8、H5N6、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し、ウイルスライブラリーの構築を目的として、地方衛生研究所の協力のもと、渡り鳥より採取した糞便を用いて鳥インフルエンザウイルスの分離培養を試みたが、本年度はウイルスを分離する事はできなかった。[高山郁代、中内美名、齊藤慎二、小田切孝人、影山努]

10. 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 8 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、2 カ所の地方衛生研究所から各 1 株のウイルスが分離され、それぞれ A(H1N1)pdm09、A(H1N2)亜型と同定された。また、全長ウイルス遺伝子配列を決定し、A(H1N2)ウイルスはヒトおよびブタインフルエンザウイルス間で遺伝子交雑が起こっていた事が確認された。[齊藤慎二、高山郁代、中内美名、小田切孝人、影山努]

11. 季節性インフルエンザウイルスの鶏卵分離

現行の季節性インフルエンザワクチン製造株は、臨床検体から発育鶏卵を用いて分離されたウイルスから開発されている。しかし、最近の季節性インフルエンザウイルス (特に A/H3N2) は鶏卵での分離効率が低下している。そこで、鶏卵で分離され、かつ、抗原性は市中流行株に近いウイルスの分離を試み、季節性ワクチン製造株の開発に資することを

目的とした。そのため、国内の医療機関から提供された臨床検体を発育鶏卵に接種し、ウイルス分離を試みた。その結果、計 79 株[A(H1N1)pdm09:30 株、A(H3N2):21 株、B 型ビクトリア系統:4 株、B 型山形系統:24 株]のウイルスの分離に成功した。このうち、遺伝子解析および抗原性解析の結果を踏まえて、妥当と評価された4株を WHO のワクチン製造株開発機関に、ワクチン製造株の親株として提供した。各機関では提供した親株からワクチン製造株候補として高増殖リアソータントが開発された。

[鈴木康司、浜本いつき、有田知子、渡辺佳世、高橋仁、信澤枝里、小田切孝人]

12. 季節性インフルエンザワクチン製造株候補の解析

11. の WHO 関連機関で開発された高増殖リアソータント 5 株に対し、遺伝子解析および抗原性解析 (two-way test) を行い、ワクチン製造株候補としての妥当性を評価した。妥当性の基準は、親株および当該シーズンの WHO 推奨抗原的基準株 (WHO 基準株) との抗原的同等性とした。対象とした高増殖リアソータントは、

- (1) A/Tokyo/EH1608/2017(CBER-13)(H1N1)pdm09、
- (2) A/KANAGAWA/ZC/1617(CBER-14A)(H3N2)、
- (3) A/KANAGAWA/ZC/1617(CBER-14B)(H3N2)、
- (4) A/Kanagawa/IC1618/2017(CBER-21)(H3N2) および
- (5) A/Kanagawa/AC1709/2017(NYMCX-323)(H3N2) である。

(1) A/Tokyo/EH1608/2017(CBER-13)(H1N1)pdm09 は親株および 2018/19 シーズン北半球向け WHO 基準株 (A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09) と抗原的に同等と評価された。(2)(3) 同親株 A/Kanagawa/ZC1617/2017

(H3N2)(3C.2a1b) から開発された CBER-14A、CBER-14B に関しては、CBER14A は親株とは抗原的に同等と評価されたが、2018/19 シーズン北半球向け WHO 基準株 (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2))(3C.2a1) とは、抗原的に同等とは評価されなかった。CBER-14B は、親株及び基準株のいずれとも抗原的に同等と評価された。(4) A/Kanagawa/IC1618/2017(CBER-21)(H3N2)(3C.2a2) および A/Kanagawa/AC1709/2017 (NYMCX-323)(H3N2) (3C.2a2) は、それぞれの元株と 2019 シーズン南半球向けワクチン推奨株である A/Switzerland/8060/2017(H3N2) (3C.2a2) とは、抗原的に同等であったが、2018/19 シーズン北半球向け WHO 基準株 (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2)

(3C.2a1)) とは、抗原的には同等とは評価されなかった。2018/19 シーズンは、地域や時期により流行の主流となる A/H3N2 ウイルスのクレードが異なったため、抗原性解析も、当該シーズンの基準株と親株と同じクレードの基準株の双方を用いて行った [有田知子、浜本いつき、高橋仁、鈴木康司、渡辺佳世、信澤枝里、小田切孝人、]

ワクチンの安定供給に関する業務

1. 2019/20 シーズン用鶏卵培養季節性インフルエンザワクチン製造株候補の準備

2019/20 シーズン用ワクチン製造株の選定にあたり、下記製造株候補の輸入および SPF 卵を用いての増殖を行なった。

- A(H1N1)pdm09: A/Tokyo/EH1608/2017(CBER-13)、
A/Brisbane/02/2018(IVR-190)
A(H3N2): A/Kanagawa/ZC1617/2017(CBER-14A)、
A/Kanagawa/ZC1617/2017(CBER-14B)、A/Abu Dhabi/
240/2018(CBER-25A)、A/Abu Dhabi/240/2018(CBER-25C)、
A/Switzerland/3330/2017(NIB-110)、A/Switzerland/
8086/2017(NIB-112)、A/Singapore/GP0454/2018(NIB-114)、
A/Sydney/22/2018(NIB-115)、A/Brisbane/1/2018(X-311)、
A/Brisbane/1/2018 (X-311A)、A/Wisconsin/4/2018 (X-319)、
A/Wisconsin/4/2018(X-319A)、A/Kansas/14/ 2017(X-327)、
A/Brisbane/192/2017(IVR-187)、
A/RhodeIsland/01/2018(IVR-188)

ワクチン製造所で増殖性、蛋白収量等の検討を行うため、A(H1N1)pdm09 を 1 株と A(H3N2) を 6 株を試験交付、A(H1N1)pdm09 を 2 株と A(H3N2) を 7 株分与 (仮交付) した。ワクチン製造所における増殖性や蛋白収量等の情報は、2019/20 シーズンワクチン株検討会議に供され、ワクチン製造株検討資料として共有された。[鈴木康司、渡辺佳世、有田知子、高橋仁、信澤枝里、小田切孝人]

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 (SRD) 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。更に、平成 27 年度からの 4 価ワクチン導入にともない、生物学的製剤

基準の一部改正が実施され、B 型株の SRD 試験方法の実施区分が制定された。このような状況に対応するため、本年度の参照インフルエンザ HA ワクチン(含有ワクチン株: A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180)(H1N1pdm09) 、 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186)(H3N2) 、 B/Phuket/3073/2013、B/Maryland/15/2016(BX-69A))を使用して各試験の測定精度、また、各製造所の測定値との乖離についての検討を実施した。[嶋崎典子、原田勇一、仲山紀子、佐藤佳代子、板村繁之;楠英樹(血液・安全性研究部)、持田恵子(細菌第二部)、小田切孝人]

2. 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

2018-19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 A(H1N1)pdm09 亜型 2 株、A(H3N2)亜型 6 株の試験交付株、A(H1N1)pdm09 亜型 2 株、A(H3N2)亜型 7 株の仮交付株について、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に試験交付及び仮交付株の無菌試験を実施した。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、佐藤佳代子、仲山紀子、中村一哉、佐藤彩、信澤枝里、板村繁之、小田切孝人]

3. ワクチン株製造施設の運用

パンデミック及びプレパンデミック用のインフルエンザワクチン株の製造施設について、GMP の手法を基にした形で運用している。本施設の運用に必要とされている環境モニタリングの実施及び記録の保管、実験室清浄化作業の実施及び記録の保管、昆虫相診断の実施及び対応策の検討などを行った。[佐藤佳代子、仲山紀子;伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、網康至、須崎百合子(動物管理室)、板村繁之、小田切孝人]

国際協力関係業務

1. 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、8 月に

サンクトペテルブルクで開催された 7th Meeting of the WHO Expert Group for GISRS on Surveillance of Antiviral Susceptibility に出席し、抗インフルエンザ薬耐性株のサーベイランス強化に関する議論を行った。また 2016 年第 21 週から 2017 年第 20 週に検出された世界各国の 13,672 株のインフルエンザウイルスについて、抗インフルエンザ薬に対する感受性試験の結果を総括した。その結果、耐性株の検出率は 0.2%で、調査を開始した 2012/13 シーズン以降で最も低かった。[高下恵美、小田切孝人]

2. WHO 世界インフルエンザ監視対応システムにおける流行株の 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システムメンバーである 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) を用いて流行株の解析をするため、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ウイルスの抗原解析データおよび遺伝子解析データを 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。[桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、秋元未来、三浦秀佳、渡辺佳世、渡邊真治、小田切孝人]

3. ワクチン株選定のためのウイルス進化・適応予測分析への協力

ウイルス進化・適応予測分析を行うため、2 つの予測モデリング・グループ (Fred Hutchinson Cancer Research Center & University of Basel team および Institute for Advanced Study, University of Glasgow & University of Cologne team) へ A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ウイルスの抗原解析データおよび遺伝子解析データを提供した。得られた成績は、WHO ワクチン株選定会議で協議され、ワクチン株選定の参考資料とされた。[桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、秋元未来、三浦秀佳、渡辺佳世、渡邊真治、小田切孝人]

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への参画

9 月と 2 月にメルボルンおよび 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、交差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。

7月に「第12回西太平洋－東南アジア地域 国立インフルエンザセンター会議」に出席し、WHO 協力センターと国立インフルエンザセンターの関係の再確認、および WHO 協力センターの役割の再認識と今後の方向性について議論した。
[渡邊真治、藤崎誠一郎、小田切孝人]

5. ベトナム・ホーチミン・パスツール研究所におけるインフルエンザ株サーベイランスに関わる基本的な技術の技術支援

ベトナムにおけるインフルエンザ株サーベイランスの強化を目的に、ベトナム・ホーチミン・パスツール研究所にて、サーベイランスに関わる基本的な技術(細胞培養、ウイルス分離、遺伝子解析、抗原性解析など)の技術指導および現地流行状況等の情報収集を行った。[白倉雅之]

6. 台湾 CDC 研究者に対する遺伝子解析の技術研修

次世代シーケンサーMinION を用いた遺伝子解析技術の習得を目的として、2018年11月19日と22日の2日間研修を行った。MinION 機器およびサンプル調製の説明と、得られたデータの解析手法について講義を行なった。[藤崎誠一郎; 鈴木仁人(薬剤耐性研究センター)]

7. 国際協力機構(JICA)研修への参画

JICA 主催の「ベトナム国 感染症の予防・対応能力向上のための実験室の機能及び連携強化プロジェクト」研修に講師として参画し、インフルエンザの診断および検査外部精度評価について講義を行った。[影山努]

8. 国立保健医療科学院研修への参画

国立保健医療科学院主催の「平成30年度短期研修 ウイルス研修」に講師として参画し、鳥インフルエンザウイルスの流行状況および検査外部精度評価について講義を行った。
[影山努]

9. 国際協力機構(JICA)研修への参画

JICA 主催の「重症感染症などのアウトブレイク対応強化のための実地疫学(管理者向け)」研修に講師として参画し、鳥

インフルエンザウイルスの流行状況および検査診断について講義を行った。[影山努]

10. 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30年8月にサンクトペテルブルクで開催された 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 に出席し、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]

11. モンゴル National Influenza Center (NIC)におけるインフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症サーベイランスに関する共同研究

モンゴル NIC、オルホン県、ダルハン・オール県、ホフド県、ドルノド県地方研究所の5か所において、これまで当センターで構築した RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの亜型同定、ウイルス性呼吸器感染症の検出方法のサーベイランスへの応用を目的とした共同研究を継続して実施した。
[中内美名]

12. ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE) およびホーチミン・パスツール研究所の National Influenza Center (NIC)におけるインフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症診断に関する共同研究

ベトナム NIC において、これまで当センターで構築したリアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの亜型同定やウイルス性呼吸器感染症の検出をベトナム地方研究所へ導入することを目的とした共同研究を継続して実施した。[高山郁代、影山努]

13. 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

WHO ERL の一員として6月及び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、原田勇一、小田切孝人]

研修業務

1. 平成 30 年度国立保健医療科学院ウイルス研修における講義および赤血球凝集抑制試験の技術研修
平成 30 年 11 月 19 日に当該研修参加の地衛研職員を対象にインフルエンザウイルスの講義を行った。また同 20 日に赤血球凝集抑制試験の技術研修を行った。[岸田典子、中村一哉、佐藤彩、白倉雅之、渡邊真治、小田切孝人]
2. 検疫所へのインフルエンザウイルスの遺伝子検出および亜型同定法についての診断検査技術研修
主要検疫所 14 ヶ所の検査担当職員を感染研に招聘し、リアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法を用いたインフルエンザ遺伝子検査実習を行った。特に研修では、喀痰検体の処理方法、リアルタイム RT-PCR 法による検査結果の解釈方法やトラブルシューティングに重点を置いた。また、研修では各検疫所からの検査対応相談にも個別に対応し、研修成果が現場で反映されるように連携の強化が図られた。[影山努、中内美名、高山郁代、齊藤慎二]
3. インフルエンザウイルスの遺伝子検出および亜型同定法についての検疫所に対する外部精度評価の実施
主要検疫所 14 ヶ所に対して、核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)によるインフルエンザウイルスの型・亜型診断検査の外部精度評価(EQA)を実施した。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あると考えられる場合は、各所でトラブルシューティングを実施してもらい、結果に対する助言を行った。また、EQA の事後研修を実施し、各所とトラブルシューティングの結果を共有して、検疫所におけるインフルエンザウイルスの遺伝子検査精度の向上を図った。[影山努、中内美名、高山郁代、齊藤慎二]
4. モンゴルにおけるインフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症診断に関する技術指導
モンゴル NIC においてオルホン県、ダルハン・オール県、ホブド県、ドルノド県地方研究所の技術者に対し、リアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるインフルエンザウイル

スの亜型同定、ウイルス性呼吸器感染症の検出について技術指導を行った。[中内美名]

5. 日中医学協会主催「JICA 2018 年度国別「感染症予防及び対策」コース本邦研修」への参画

平成 30 年 12 月にインフルエンザ動物モデル、ワクチン、診断と治療に関する講習や所内見学を行った。[浅沼秀樹、影山努、鈴木康司]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表
 1. Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I. Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season. *J Infect Chemother*. 24:407-413, 2018.
 2. Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM. Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam. *Influenza Other Respir Viruses*. 13:248-261, 2019.
 3. Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, Pattinson DJ, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Yasuhara A, Usuku S, Okubo I, Toyozawa T, Sugita S, Smith DJ, Watanabe S, Kawaoka Y. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Euro Surveill*. 24, 2019.
 4. Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. 71:234-238, 2018.
 5. Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri

- T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. *Antiviral Res.* 157:38-46, 2018.
6. Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol.* 9:3026, 2018.
 7. Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill.* 24:1800698, 2019.
 8. Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Euro Surveill.* 24:1900170, 2019.
 9. Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks. *Arch Virol.* 164: 535-545, 2018.
 10. Shibata A, Harada R, Okamoto M, Matsuno K, Arita T, Suzuki Y, Shirakura M, Odagiri T, Takemae N, Uchida Y, Saito T, Sakoda Y, Osaka H. Characterization of a novel reassortant H7N3 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a poultry meat product taken on a passenger flight to Japan. *J Vet Med Sci.* 81: 444-448, 2019.
 11. Ackerman EE, Kawakami E, Katoh M, Watanabe T, Watanabe S, Tomita Y, Lopes TJ, Matsuoka Y, Kitano H, Shoemaker JE, Kawaoka Y. Network-Guided Discovery of Influenza Virus Replication Host Factors. *MBio.* 9: e02002-18, 2018.
 12. Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Development and evaluation of new real-time RT-PCR assays for identifying the influenza A virus Cluster IV H3N2 variant. *Jpn J Infect Dis.* 25;72(2):127-129, 2019.
 13. Saito S, Takayama I, Nakauchi M, Nagata S, Oba K, Odagiri T, Kageyama T. Development and evaluation of a new real-time RT-PCR assay for detecting the latest H9N2 influenza viruses capable of causing human infection. *Microbiol Immunol.* 63(1): 21-31, 2019.
 14. Saito S, Sano K, Suzuki T, Ainai A, Taga Y, Ueno T, Tabata K, Saito K, Wada Y, Ohara Y, Takeyama H, Odagiri T, Kageyama T, Ogawa-Goto K, Multihartina P, Setiawaty V, Pangesti KNA, Hasegawa H. IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of anti-influenza virus broadly neutralizing antibody. *PLoS Pathog.* 3;15(1):e1007427, 2019.
 15. Nakauchi M, Nagata N, Takayama I, Saito S, Kubo H, Kaida A, Oba K, Odagiri T, Kageyama T. Propagation of Rhinovirus C in Differentiated Immortalized Human Airway HBEC3-KT Epithelial Cells. *Viruses.* 11(3), E216, 2019.
 16. Nakauchi M, Takayama I, Takahashi H, Semba S, Saito S, Kubo H, Kaida A, Oba K, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rhinovirus detection. *J Med Virol.* 91:1232-1238, 2019.
 17. Takayama I, Nakauchi M, Takahashi H, Oba K, Semba S, Kaida A, Kubo H, Saito S, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Development of real-time fluorescent

- reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*. 267:53-58, 2019.
18. Shirato K, Semba S, El-Kafrawy S, Hassen A, Tolah A, Takayama I, Kageyama T, Notomi T, Kamitani W, Matsuyama S, Azhar E. Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol Methods*. 258:41-48, 2018.
 19. Shimasaki N, Okaue A, Kikuno R, Shinohara K. Comparison of the Filter Efficiency of Medical Nonwoven Fabrics against Three Different Microbe Aerosols. *Biocontrol Sci.*, 23, p61-69, 2018.
 20. Sato K, Takahashi Y, Adachi Y, Asanuma H, Ato M, Tashiro M, Itamura S. Efficient protection of mice from influenza A/H1N1pdm09 virus challenge infection via high avidity serum antibodies induced by booster immunizations with inactivated whole virus vaccine. *Heliyon* 5 (2019) e01113, 2018.
 21. Hitoshi Takahashi, Shiho Nagata, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama. Establishment of the cross-clade antigen detection system for H5 subtype influenza viruses using peptide monoclonal antibodies specific for influenza virus H5 hemagglutinin. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(4):758-763, 2018.
 22. Sun, L., Kono, N., Toh, H., Xue, H., Sano, K., Suzuki, T., Ainai, A., Orba, Y., Yamagishi, J., Hasegawa, H., Takahashi, Y., Itamura, S., Ohnishi, K. Identification of Mouse and Human Antibody Repertoires by Next-Generation Sequencing. *J. Vis. Exp.* (145), e58804, 2019.
 23. Hiradate Y, Sasaki E, Momose H, Asanuma H, Furuhashi K, Takai M, Aoshi T, Yamada H, Ishii KJ, Tanemura K, Mizukami T, Hamaguchi I. Development of screening method for intranasal influenza vaccine and adjuvant safety in preclinical study. *Biologicals*, Sep;55:43-52, 2018.
2. 和文発表
 1. 高下恵美 ザナミビル, ラニナミビルの耐性は出るのでしょうか? インフルエンザ診療、ガイド 2018-19. 181-183, 2018.
 2. 菅谷憲夫、高下恵美、河岡義裕 バロキサビル、マルボキシルについて。インフルエンザ、20:7-12, 2019.
 3. 高下恵美 RNA ポリメラーゼ阻害薬について:基礎的な観点から。インフルエンザ、20:17-21, 2019.
 4. 高下恵美、森田博子、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、川上千春、清水耕平、小澤広規、宇宿秀三、田中伸子、大久保一郎、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、全国地方衛生研究所 新規抗インフルエンザ薬バロキサビル、マルボキシル耐性変異ウイルスの検出。病原微生物検出情報、40:30-31, 2019.
 5. 中村一哉、藤崎誠一郎、高下恵美、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、菅原裕美、渡辺佳世、森田博子、渡邊真治、小田切孝人、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ 2017/18 シーズンのインフルエンザ分離株の解析。病原微生物検出情報、39:184-189, 2018.
 6. 渡邊真治 近年のインフルエンザの動向と抗インフルエンザ薬の耐性状況。医薬ジャーナル、54:2197-2202, 2018.
 7. 渡邊真治 インフルエンザワクチン ~ウイルス株の選ばれ方~。外来小児科、21:391-396, 2018.
 8. 渡邊真治 季節性インフルエンザの特徴。臨床と研究、95:1186-1190, 2018.
 9. 影山努、中内美名、高山郁代、齊藤慎二、小田切孝人 鳥・ブタインフルエンザウイルスのヒト感染事例の状況について。病原微生物検出情報、39(11) 200-202, 2018.
 10. 小田切孝人 今冬(2017/18 シーズン)のインフルエンザワクチンに起こったこと。Bio Clinica 33 (3): 225-231,2018.
 11. 佐藤佳代子、田代真人、板村繁之 TLR9 アゴニストはインフルエンザワクチンのブースター免疫において

- ウイルス特異的抗体の親和性と ADCC 活性を増強する。臨床免疫・アレルギー科、70(4):325-30, 2018.
12. 浅沼秀樹、伊保澄子、藤橋浩太郎 CpG-ODN 併用経鼻インフルエンザワクチンの有効性と分泌型 IgA 抗体の重要な役割。臨床免疫・アレルギー科、70(4):345-50, 2018.
13. 浅沼秀樹、立石恒一朗、伊保澄子 新規経鼻アジュバント CpG ODN G9.1 のインフルエンザワクチンとしての有効性と安全性。炎症と免疫、2019 年 3 月号 (Vol.27 No.2).
5. Shirato K, Semba S, Sherif A. El-Kafrawy, Ahmed M. Hassan, Ahmed M. Tolah, Takayama I, Kageyama T, Notomi T, Kamitani W, Matsuyama S, Esam Ibraheem Azhar. Development of Fluorescent Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) using Quenching Probes for the Detection of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. American Society for Virology 2018 Annual Meeting, Maryland. 14-18 July 2018.
6. Hashimoto K, Norito S, Sakuma H, Suzuk S, Shirato K, Kageyama T, Takeda M, Hosoya M. Detection of RS virus and multiple respiratory viruses in inpatients with respiratory tract infection by direct real-time RT-LAMP. 11th International Respiratory Syncytial Virus Symposium. Asheville 31 October - 4 November 2018.

II. 学会発表

1. 国際学会
1. Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 17th Negative Strand Virus Meeting, Verona, Italy, June 2018.
2. Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. 17th Negative Strand Virus Meeting, Verona, Italy, June 2018.
3. Takahashi T, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Establishment of the cross-clade antigen detection system for H5 subtype influenza viruses using peptide monoclonal antibodies specific for influenza virus H5 hemagglutinin. 17th Negative Strand Virus Meeting 2018, Verona, Italy, June 2018.
4. Takahashi H, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Establishment of the cross-clade antigen detection system for H5 subtype influenza viruses using peptide monoclonal antibodies specific for influenza virus H5 hemagglutinin. 17th Negative Strand Virus Meeting, Verona, June 2018.
7. Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. 6th isirv Antiviral Group Conference. Washington DC, USA. November 2018.
8. Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura : Establishment of in vitro assays for the potency of the influenza vaccines based on the macrophage activations. 6th International Influenza Meeting, Munster, Germany, September 2018.
9. Hideki Asanuma, Akira Ainai, Makoto Ujike, Seichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Shinji Watanabe, Noriyo Nagata, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Masato Tashiro. Increased pathogenicity in mice of a mouse-adapted influenza H7N9 virus was associated with delayed host innate immune responses. 6th International Influenza Meeting, Munster, Germany, September 2018.
10. Jun-ichi Maeyama, Hideki Asanuma, Daisuke Hayashi, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Matsumoto Sohkiichi, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto. A novel phosphodiester backbone oligodeoxynucleotide promotes vaccine ability to tuberculosis and Flu. 12th Vaccine Congress,

Budapest, Hungary, September 2018.

2. 国内学会

1. 渡邊真治、桑原朋子、高下恵美、白倉雅之、藤崎誠一郎、三浦秀佳、秋元未来、中村一哉、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、菅原裕美、小田切孝人 鶏卵分離埼玉株 NA で認められたアミノ酸変異の生物学的意義。第 32 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、香川、2018 年 6 月
2. 信澤枝里 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化への取り組み。第 32 回インフルエンザ研究者交流の会、香川、2018 年 6 月
3. 高下恵美 インフルエンザウイルスのグローバルサーベイランス。第 19 回インフルエンザ研究会、新宿、2018 年 9 月
4. 信澤枝里 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化への取り組み。名市大細菌学セミナー、名古屋、2018 年 10 月
5. Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution. 第 66 回日本ウイルス学会、京都、2018 年 10 月
6. Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第 66 回日本ウイルス学会、京都、2018 年 10 月
7. Kisu T, Ito H, Hagiwara A, Watanabe O, Kadji FMN, Sato K, Omiya S, Takashita E, Nobusawa E, Nishimura H. Induction of neuraminidase inhibitory antibody in recipients of an influenza split vaccine. 第 66 回日本ウイルス学会、京都、2018 年 10 月
8. 齊藤慎二、Vu Thi Tuong Van、Nguyen Gia Binh、Phuong Truong Thai、古屋博行、高山郁代、Pham Thi Phuong Thuy、Thanh Do Van、Dao Xuan Co、Phuong Phan Thu、Do Duy Cuong、Le Thi Ngan、Bui Minh Vuong、Le Trung Dung、新城雄士、小田切孝人、中島典子、影山努. Respiratory pathogen detection and prognosis in hospitalized adult patient with acute respiratory infection in Bach Mai Hospital in Vietnam. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
9. Nakauchi M, Takayama T, Saito S, Nagata N, Kaida A, Kubo H, Oba K, Kageyama K, Odagiri T. Propagation of human rhinovirus C in differentiated immortalized human airway epithelial cells. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
10. Takayama I, Nguyen GB, Vu TTV, Truong TP, Thanh DV, Pham TPT, Fujisaki S, Odagiri T, Kageyama T, Nakajima N. Analysis of genetic dynamics of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in upper and lower respiratory tracts using next-generation sequencing. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
11. 佐野芳、齊藤慎二、小谷 治、Elly van Riet、相内章、田畑耕史郎、高橋宜聖、横山勝、佐藤裕徳、鈴木忠樹、長谷川秀樹 Analysis of escape mutant viruses of an intranasal influenza vaccine-derived broadly neutralizing antibody clone. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
12. Takahashi H, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Preparation of monoclonal antibodies to detect multiple clades of influenza A/H5 viruses. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
13. Noriko Shimasaki, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura: Development of antigen-capture ELISA to measure the HA content of two influenza B vaccine viruses included in quadrivalent influenza vaccine. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月
14. Hamamoto I, Takahashi H, Mizuta K, Odagiri T, Nobusawa E. Susceptibility of NIID-MDCK cells to human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) in the presence of influenza virus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月

15. 田畑耕史郎、鈴木忠樹、佐野芳、齊藤慎二、藤井信、齋藤訓平、原田陽介、相内章、長谷川秀樹
Secretary component による四量体分泌型 IgA 抗体形成促進の分子機構解析。第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月
16. 佐野芳、齊藤慎二、小谷治、相内章、Elly van Riet、田畑耕史郎、高橋宜聖、横山勝、佐藤裕徳、鈴木忠樹、長谷川秀樹 経鼻ワクチンにより誘導された抗インフルエンザ HA ステム抗体のウイルス感染防御機構。第 22 回日本ワクチン学会学術集会、神戸、2018 年 12 月
17. 佐藤佳代子、浅沼秀樹、板村繁之 ヒト由来マクロファージ様細胞の活性化能を指標とした新たなインフルエンザウイルスのワクチン力価定量法の構築。第 22 回日本ワクチン学会学術集会、神戸、2018 年 12 月
18. 信澤枝里 細胞培養季節性インフルエンザワクチン実用化への取り組み。第 22 回日本ワクチン学会学術集会、神戸、2018 年 12 月
19. Kayoko Sato, Hideki Asanuma : Priming immunization with whole-virion influenza vaccines is essential for induction of ADCC activities of virus-specific antibodies. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月
20. Koichiro Tateishi, Kayoko Sato, Eita Sasaki, Takuo Mizukami, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Norio Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Hideki Asanuma. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月
21. 高下恵美、森田博子、小川理恵、中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、桑原朋子、岸田典子、三浦秀佳、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人 新規抗インフルエンザ薬パロキサビルマルボキシルに対する耐性株サーベイランス。8th Negative Strand Virus-Japan. 沖縄、2019 年 1 月
22. 信澤枝里 細胞培養季節性インフルエンザワクチン実用化への取り組み。8th Negative Strand Virus-Japan. 沖縄、2019 年 1 月
23. 佐藤佳代子、浅沼秀樹 インフルエンザワクチン特異的 ADCC 抗体の産生誘導には全粒子ワクチン初回免疫が必要である。第 12 回次世代アジュバント研究会、大阪、2019 年 1 月
24. 立石恒一郎、佐藤佳代子、佐々木永太、水上拓郎、前山順一、伊保澄子、山本三郎、山本典生、藤橋浩太郎、浅沼秀樹 CpG-ODN G9.1 の経鼻インフルエンザワクチンにおける有効性と安全性の評価。第 12 回次世代アジュバント研究会、大阪、2019 年 1 月
25. 影山努 鳥・ブタ由来インフルエンザウイルスの国内外の流行状況。平成 30 年度 希少感染症診断技術研修会、東京、2019 年 2 月