

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 24 年 6 月 1 日付で浅沼秀樹が第 6 室長に昇任し、平成 24 年 4 月 1 日に相内章、平成 24 年 12 月 1 日に浜本いつき、平成 25 年 3 月 29 日に高山郁代が各々任期付研究員から研究員に採用された。一方、平成 25 年 2 月 1 日付で川口晶が感染病理部第 3 室に配置換となった。

(H1N1)2009 パンデミック対応が一段落して、センター本来の研究業務である通常の季節性インフルエンザ対応、ワクチン品質管理および新型インフルエンザへの事前準備を本格的に推進した。平成 24 年夏には米国でブタ H3N2v ウイルスの流行が起こり、300 名以上の患者発生があった。パンデミックの可能性に対するリスク評価を行ない、これに対応して検査体制、ワクチン準備を進めた。

流行動向調査(サーベイランス)事業を地衛研、感染症情報センター、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

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。更に、迅速で効率のよい各種検査法を開発して国内外に普及し、また一部の地衛研に対して診断検査の品質管理試験を実施した。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レンス業務を担当し、生物学的製剤 GMP にも協力した。また国家検定 SOP 改定、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。通常世界各国の分離株・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、平成 25 年度までに、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の確立を目標に、細胞培養ワクチン及び経鼻接種方式の実用化を、WHO 及び国内外メーカーと協力して推進した。臨床試験を実施して、製造施設の建設を推進した。また細胞培養ワクチン製造用シードウイルスの

作製法、品質確保の確立を進めた。

国の新型インフルエンザ体制の基本対応の再構築のために、新型インフルエンザ等対策特別措置法、同政令の制定および行動計画、対策ガイドラインの改訂作業に協力した。

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. ブタ由来のA(H3N2)バリエーション(A(H3N2)v)ウイルスに対する日本人の抗体保有状況に関する研究

2011年から2012年にかけて米国でブタ由来A(H3N2)vウイルスのヒト感染事例が急増し、本ウイルスによる世界的な流行が懸念された。本事例は米国各地における農業見本市でブタと濃厚接触した主に小児で発生したが、幸いヒト-ヒト感染拡大には至っていない。しかし、散発事例の頻発が引き金となりヒト社会での流行拡大が起こった際には、わが国への波及は確実であり、その際はA(H3N2)v ワクチンの緊急製造、ワクチンの優先接種対象者の特定など接種戦略の緊急策定が必要になる。このため、事前に日本国民のA(H3N2)vウイルスに対する抗体保有状況を把握することを目的に、各年齢層（1歳～87歳）総数300名について調査を行った。その結果、14歳未満の年齢層には抗体がなく、A(H3N2)vウイルスの流行が起こった場合は、この年齢層が流行の中心となり、ワクチンの優先接種対象者となることが明らかになった。本研究成果は、速やかに厚生労働省新型インフルエンザ対策会議、感染研新型インフルエンザ対策WG、WHO世界インフルエンザ監視対応ネットワークで情報共有され、また、論文として投稿中である。[岸田典子、今井正樹、徐紅、多屋馨子*、菅原裕美、伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、田代真人、小田切孝人:*感染症情報センター]

2. 孵化鶏卵馴化によって起こる変異の研究

MDCK細胞分離のH3N2ウイルスを発育鶏卵（卵）に馴化させた際に起こるHA遺伝子変異と抗原性変化を解析した。解析した8株のうち、6株はHA蛋白の194位のアミノ酸置換（L→P）、2株は156位のアミノ酸置換（H→R）をそれぞれ起こしていた。これらについて、8

代目まで継代した株に対するフェレット抗血清を作製し、細胞分離の原株との間でHI試験による抗原性解析を行った。卵馴化により獲得したこれら変異は、抗原性には反映されず、原株の抗原性を維持していた。この情報は、インフルエンザワクチン開発にとって有用情報となった。

[徐紅、藤崎誠一郎、土井輝子、佐藤彩、金南希、伊東玲子、田代真人、小田切孝人]

3. 新規抗インフルエンザ薬感受性試験系の構築

2011年3月に新規抗インフルエンザ薬ファビピラビル（T-705）が日本で承認申請され、現在審査が行われている。ファビピラビルはノイラミニダーゼを標的とする既存の抗インフルエンザ薬とは異なる新規機序をもつため、現行の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスにおいて実施されている薬剤感受性試験系は利用できない。したがって、ファビピラビル耐性株の検出には新たな試験系の構築が必要となった。このため、ファビピラビルに対する感受性試験系を新規に構築した。さらに、構築した試験系を用いて、ファビピラビルの臨床試験において採取されたファビピラビル投与前後の検体から分離されたA(H1N1)pdm09、A(H3N2)およびB型ウイルスを解析し、ファビピラビル耐性株のスクリーニングを行った。その結果、ファビピラビル投与後に薬剤感受性が低下したウイルスは検出されなかった。本研究成果は、WHO抗ウイルス薬WG会議へ報告され海外委員と情報共有された。[高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、土井輝子、田代真人、小田切孝人]

4. ノイラミニダーゼ阻害剤感受性低下を示したインフルエンザウイルスの性状解析

昨年度に引き続き、インフルエンザウイルスB型分離株に、ノイラミニダーゼ（NA）阻害剤に対して感受性の低下を示す2株を検出した。これら2株は既知の薬剤耐性アミノ酸置換を有していなかったが、NA内に他の流行株には見られないアミノ酸置換（Q138R, G140R）をそれぞれ有していた。これらのアミノ酸置換が薬剤感受性低下の原因であるかを確認するため、分離株を用いてブランク純化ウイルスを作製し、上記アミノ酸置換を持つウイルスが薬剤感受性低下を示すことを確認した。これによりQ138R, G140RがNA阻害剤に対し感受性低下を引

き起こすことが明らかとなった。[藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、横山 勝*、佐藤裕徳*、江島美穂、金 南希、佐藤 彩、田代真人、小田切孝人：*病原体ゲノム解析研究センター]

5. リアルタイム RT-PCR 法を用いた薬剤耐性マーカー S247N 検出系の構築

A/H1N1pdm09 ウイルスの薬剤感受性マーカーである NA タンパク質の H275Y 変異と共に S247N 変異が加わると、ウイルスが劇的な薬剤耐性能を獲得することが報告された。この変異株が流行した際にスクリーニングを簡便に行えるよう、以前に構築した NA タンパク質の H275Y 変異検出法と同様、NA タンパク質の S247N 変異を迅速かつ簡便に検出できる方法をリアルタイム RT-PCR 法により構築した。[高山郁代、中内美名、田代真人、影山 努]

6. 呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築

核酸増幅法として知られている RT-LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を用いて、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う。本年度は検出候補となるウイルスの選択と核酸増幅の標的となる遺伝子の決定、標的遺伝子部分を増幅させるプライマーセットの設計を行った。さらに、検出するウイルスの標的遺伝子を人工合成した陽性コントロールを作製し、設計したプライマーセットを用いて RT-LAMP 法による核酸増幅・検出を行ったところ、陽性コントロール核酸の増幅が確認された。以上の結果から、今回設計したプライマーセット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]

7. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製および反応性の検討

H5N1 インフルエンザ迅速診断法の構築などに応用するため、H5 HA 特異的なモノクローナル抗体を作製し、その反応性や特異性について検討を行った。H5 HA 特異

的なモノクローナル抗体は、H5 HA で保存されており且つ立体構造の表面上に位置し抗原部位と成り得る領域を選定し、この部分の合成ペプチドをマウスに免疫して得た。得られた抗体クローンは H1 および H3 亜型ウイルス抗原に対して反応性を示さなかった。以上の結果から、今回得られた抗体クローンは H5 HA の保存されている領域を免疫原としていることから、H5N1 ウイルスの幅広いクレードの HA 抗原に対して反応性を示すと考えられる。また、H1 および H3 抗原に対しては反応性を示さなかったことから高い特異性を有していることも示唆された。[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]

8. H5N1 ウイルスの HA タンパク質を認識する抗体のエピトープ解析

H5N1 ワクチン株(NIBRG-14)を抗原として HA タンパク質を認識するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いた新型インフルエンザワクチンの品質管理試験や新型インフルエンザ診断系構築への応用を行っている。作製した3種類のモノクローナル抗体と NIBRG-14 ウイルス株を混合し、培養細胞に感染させ、そこから産生されてくるエスケープミュータントウイルスの HA タンパク質の遺伝子解析を行い、それぞれの抗体が認識する HA タンパク質のアミノ酸部位(抗原エピトープ)を推定した。その結果、推定される部位は全て H5 HA タンパク質の表面上であり、抗体の種類により異なる2つの認識部位が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、河野直子、大西和夫*、小林美栄*、横田(恒次)恭子*、田代真人、板村繁之、影山 努：*免疫部]

9. ヒト血清抗体による新型インフルエンザウイルス A/H1N1/pdm09 HA 抗原領域の認識機構の解析

2009年4月にブタウイルスを起源とする A/H1N1pdm09 (新型ウイルス)によるパンデミックが発生した。新型ウイルスは、従来の季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス(季節性ウイルス)とは抗原性が異なるが、ヒトの血清抗体が、新型ウイルス主要抗原 HA(新型 HA)上のどこかの抗原領域を認識するのかは、明らかにされていない。

そこで、新型ウイルスワクチン接種者（40名）の血清抗体が認識する HA 上のエピトープ構造の詳細を解析した。その結果、調べた血清の約 70%が Ca2 あるいは Sa+Sb 領域に結合し、また約 50%の血清は複数の抗原領域に結合することが判明した。さらに、新型 HA に対するモノクローナル抗体エスケープ変異株 19 株に対する反応性を検討した結果、147 位、158 位、159 位の変異の影響を受ける血清が約 50%同定された。[中内美名、松寄葉子*、菅原勘悦*、西村秀一**、田代真人、信澤枝里 *山形大学医学部 **国立病院機構仙台医療センター]

10. 新型インフルエンザ A/H1N1pdm09HA の抗原構造の解析

新型インフルエンザ H1N1HA の抗原構造を明らかにする目的で、新型インフルエンザに対する中和抗体が認識するエピトープの同定を行った。A/Narita/1/ 2009 株を HA に対する 16 種類のマウス単クローン抗体存在下で培養し、各抗体に対するエスケープ変異株を 50 株ずつ、計 800 株分離した。得られたエスケープ変異株と各抗体との反応性を調べた結果、A/Narita/1/2009 の HA には中和抗体を産生する抗原領域が 4 つ存在していた。アミノ酸置換部位の解析から、3 つは H1HA の既知の抗原領域である Sa、Sb、Ca2 領域に相当し、新型 H1HA では Sa と Sb 領域が重なり合っていることが明らかになった。また、旧 H1N1 で 1997 年以降に欠失したアミノ酸残基が新型 H1HA の新たな中和エピトープになっている可能性が示唆された。[松寄葉子*、菅原勘悦*、中内美名、高橋宜聖**、田代真人、信澤枝里 *山形大学医学部、**免疫部]

11. 国内で最初に分離された A/H1N1pdm09 (A/Narita/1/2009 株) の性状解析

日本国内で初めて分離された 2009 年のパンデミック株 (A/Narita/1/2009; A/N) を発育鶏卵、MDCK 細胞およびマウスで継代し、宿主の違いにおける性状の変化を検討した。鶏卵および MDCK で分離・継代した A/N は継代に伴い、HA 価の上昇とそれぞれの宿主における感染価 (EID50 および TCID50) の増加が認められた。このとき鶏卵で継代した A/N は MDCK にも高い感染価を認めたが、MDCK で継代した A/N は鶏卵に対する感染価に変化がなかった。またマウスで継代した A/N は、マウス

だけでなく、鶏卵と MDCK に対する高い感染価も認められた。遺伝子解析および抗原性解析を行った結果、鶏卵継代株は G155E および Q223R、MDCK 継代株では G155E および N355N/T、マウス継代株では N156D および D222G の変異が認められ、宿主の違いが HA 分子の変異にも影響が認められ、さらに全ての継代株に抗原性の著しい低下が認められた。HA 以外の分子における遺伝子解析でも株毎に多様な変異が認められており、この変異の増殖性に与える影響を検討している。[浅沼秀樹、相内 章、佐多徹太郎、白倉雅之、信澤枝里、小田切孝人、長谷川秀樹、田代真人]

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に対する流行株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、オーストラリア、中国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交換された。2 月と 9 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、菅原裕美、伊東玲子、佐藤 彩、土井輝子、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. B 型インフルエンザワクチン株の開発に関する研究

現行のインフルエンザワクチンは、孵化鶏卵で増やしたウイルスから製造されている。しかし、ヒトから分離された季節性インフルエンザウイルスを孵化鶏卵で増殖させると抗原性が変化することが明らかにされている。B 型インフルエンザウイルスの場合、孵化鶏卵に馴化させるとヘマグルチニン (HA) 蛋白質の 196 あるいは 197 番目の糖鎖結合部位に変異が入り、これによって糖鎖が欠失して抗原性が変化することが報告されている。本研究では、より効果的な B 型ワクチン株の選定と開発を目

的として、孵化鶏卵で継代しても HA の糖鎖が欠損せず元の抗原性が保持されているウイルス株を作製できる手法の開発を目指した。本年度は、2009/2010 シーズンにワクチン株に選定された B/Victoria 系統の B/Brisbane/60/2008 株から 197 番目のアミノ酸に糖鎖付加部位をもつ HA 遺伝子と NA 遺伝子をクローニングした。HA と NA 遺伝子が B/Brisbane/60/2008 由来で、残りの遺伝子が B/Yamagata/1/73 株由来のリアソータントウイルスを作製した。同様に、2012/2013 シーズンにワクチン株に選定された B/Yamagata 系統の B/Wisconsin/1/2010 株から 196 番目のアミノ酸に糖鎖付加部位をもつ HA 遺伝子と NA 遺伝子をクローニングし、リアソータントウイルスを作製した。これらのリアソータントウイルスを孵化鶏卵で継代したところ、1 代目で糖鎖欠損型の HA を持つウイルスに変化することがわかった。HA 蛋白質の 141 番目のアミノ酸をアルギニンに変えた B 型ウイルスは、孵化鶏卵で増殖させても HA 蛋白質の糖鎖が維持されることが示されている。今後は、141 番目のアミノ酸をアルギニンに変えた B 型ウイルスを、リバースジェネティクス法を用いて作製し、この組換えウイルスが孵化鶏卵で継代を重ねても糖鎖が安定的に付加されるのか否かを検討する。[今井正樹、岸田典子、佐藤 彩、伊東玲子、田代真人、小田切孝人]

3. 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) (クレード 2.1.3.2) の抗原解析

2011 年～2012 年インドネシアでヒトから分離された 4 株の高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)を、インドネシア国立保健研究開発研究所 (NIHRD) より入手し [A/Indonesia/NIHRD11771/2011,A/Indonesia/NIHRD11931/2011,A/Indonesia/NIHRD11949/2012,A/Indonesia/NIHRD12379/2012]ウイルスを鶏卵で増殖の後、抗原解析を行った。分離ウイルスと同クレードの既存のワクチン候補株 A/Indonesia/5/ 2005 (IBCDC-RG2)に対するフェレット血清を用いて、HI 試験を行った結果、調べた 4 株に対する HI 価は、IBCDC-RG2 に対する HI 価より 8~16 倍低く、抗原変異が生じていることが示された。さらに、分離株のうち A/Indonesia/NIHRD11771/2011 に対するフェレット感染血清は、昨年度作製しており、この血清の

IBCDC-RG2 及び A/Indonesia/5/ 2005 に対する反応性を HI 試験で調べた結果、ホモ価から 16 倍程度の差が確認され、近年インドネシアで流行している株は、既存のワクチン株からは、抗原的に離れていることが確認され、WHO へ報告した。

[有田知子、白倉雅之、今井正樹、浅沼秀樹、信澤枝里、田代真人]

4. H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (clade 2.1.3.2)の新たなワクチン株候補の作製

インドネシア国で現在流行している H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス株が、同クレードの既存ワクチン製造株である IBCDC-RG2 株とは、抗原性が異なることが明らかとなったため、IBCDC-RG2 株に代わるワクチン株の作出を行った。インドネシア国立保健研究開発研究所 (NIHRD) から分与された高病原性鳥インフルエンザウイルスヒト分離株、A/Indonesia/ NIHRD11771/2011 を基に Reverse Genetics 法により、HA、NA 遺伝子が NIHRD11771 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-9 を作出した。NIIDRG-9 HA の開裂部位は、遺伝子操作により、多塩基性アミノ酸配列を除き、低病原性株の配列とした。SPF 鶏卵で三代継代した株を用いて、ニワトリを用いた弱毒化確認試験、トリプシン依存性試験、フェレット抗血清の作製、抗原性、免疫原性の確認、遺伝子配列の確認を行い、CELD50, EID50 の測定を行った。各試験でワクチン株としての妥当性を確認した後、さらに SPF 鶏卵で継代し、四代継代株をワーキングストックとして、配布用に保存した。

[白倉雅之、有田知子、川口 晶、今井正樹、浅沼秀樹、信澤枝里、田代真人]

5. 細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスの開発

RG 法を用いて、細胞培養インフルエンザワクチン製造用種株を作製する際の母体ウイルスの検討は、まだなされていない。細胞培養ワクチンの生産性を考慮した、高増殖性、高タンパク収量を示す種株開発は、急務の課題である。鶏卵培養で用いられている高増殖性株に匹敵する母体ウイルスの作製を試みた。検討対象として、

A/Udorn/1/73 株及び A/PR/8/34 株を用いて ATCC-MDCK 細胞における増殖性の検討を行った。その結果、A/Udorn/1/73 株は、ATCC-MDCK 細胞で 19 代継代した後にもウイルス力価として平均 10^8 pfu/ml を維持し、A/PR/8/34 株も 10^9 pfu/ml を示した。今後、プラーク純化の後、母体ウイルスとしての有用性をリアソータントウイルスを作出して検討していく。

[川口 晶、信澤枝里、田代真人]

6. H5N1 インフルエンザワクチン製造用種株候補の HA 収量の検討

ワクチン製造用種株は鶏卵での増殖性が高く、HA 収量が多いことが望ましい。H5N1 プレパデミックワクチンの株選定の一助とするため、昨年に引き続き、当センターが保有するクレード 1、1.1、2.1.3.2、2.2、2.2.1、2.2.2.1、2.3.2.1、2.3.4、7.1 に属する種株候補株 14 株に当室で作出した RG ワクチン株 (クレード 2.1.3.2) を加えて、孵化鶏卵にウイルスを接種、培養の後、ウイルスを精製し、蛋白収量及び HA 収量を測定した。その結果、既存の H5N1 ワクチン製造用種株候補ウイルスには、総タンパク収量、HA 収量が低い株が同定され、ワクチン製造用種株としての適正を検討する必要があった。特に、4 クレード (1, 2.2, 2.2.1, 7.1) に属するウイルスは、低い HA 収量を示したが、このうち、収量が最も低かった 2.2.1 に属するウイルスは、ウイルスの培養条件を検討することで、収量が約 2 倍増加し、改善が認められていた。今年度、新たに加えた NIIDRG-9 は既存の同クレードの株と HA 収量は同程度であったが、培養時間を 72 時間にすることで、約 1.5 倍の増加が認められた。

一方、HA 価で示されるウイルスの増殖性と、蛋白収量、HA 収量との間に相関関係はなかった。今後、低 HA 収量の候補株については、培養条件等の検討により、収量の改善を行い、ワクチン製造種株としての妥当性を引き続き検討することが重要である。

[有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人]

7. 2012 年度 H5N1 備蓄ワクチン株選定資料の作成

(1)平成 24 年度 H5N1 備蓄ワクチン株の選定に際し、今年度、備蓄予定のチンハイ株と同じクレードのウイルスが、エジプトで流行しているため、ワクチン株が流行株

をカバーできるのかの検討が必要になった。そのため、既存ワクチン接種者の免疫応答、ワクチン株の製造所での増殖性など、選定に必要な資料作成を行った。資料作成に際し、ワクチン製造用種株として扱うため、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 (当該事項の管轄を文科省から厚労省へ変更し、今後随時申請、検討が行えるようにした) 3. 家伝法の家畜伝染病病原体からの除外申請。4. 資料の提出に時間的制約があり、製造所での検討を、ワクチン株の家畜伝染病病原体からの除外の後に行うことは困難であったため、各製造所に家畜伝染病病原体の所持許可申請を農水省に対して行うよう指導した。さらに、H5N1 ワクチン株の掲示名称の統一化も行った。これまで、書類上あるいは各省のポジションペーパーに掲載されるワクチン株の名称に統一性がなく、不明瞭な点があった。今後、統一名称を用いて官報、ポジションペーパーに記載することとし、今回の備蓄候補株からは、厚労省、農水省の掲示は、統一名称が用いられる。[信澤枝里、田代真人]

(2)選定資料作成に関して：チンハイ株ワクチン接種者の血清を用いて、同クレードの流行株 (ワクチン株 4 株) との反応性の検討を行い、H24 備蓄ワクチン株選定の資料として供した。検討株候補に挙げた他クレード株と合わせて、抗原解析を行い、製造所へ分与する株の抗原性の確認を行った。[有田知子、白倉雅之、川口 晶、信澤枝里、田代真人]

8. ワクチンシードウイルス分離用候補細胞より分離されたウイルスの遺伝的安定性確保に関する検討

昨年度までの解析により、ワクチンシードウイルス分離用候補細胞を用いて分離されたウイルスは、候補細胞での複数回の継代により高率に遺伝子変異を起こすことが明らかとなった。そこで、継代前に分離ウイルスのクローニングを行うことで、遺伝子変異が回避できるかを検討した。その結果、ウイルスクローニングを行った場合でも分離ウイルスの遺伝的安定性確保は困難であることが明らかとなった。[中村一哉、高橋 仁、原田勇一、板村繁之、田代真人、山本典生]

9. 細胞培養型インフルエンザワクチン試作品の有効性の解析

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インフルエンザワクチンについて、マウスモデルを用いて有効性の評価を行った。ワクチンを接種されたマウスは血中にウイルス特異的抗体が誘導され、その後の致死性ウイルス感染からも生残したことから、試作ワクチンは一定の有効性を有することが明らかとなった。[原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生]

10. 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への混入可能性が高いウイルス及びヒトに健康危害を起こすウイルスを選択し、定量 PCR を用いた迷入ウイルス検出系の開発に関する研究を行った。プライマー・プローブの標的配列に変異があると検出感度が低下するため、遺伝子データベースを利用して検出に適した遺伝子領域の選定を行い、この領域に対する定量 PCR 系の構築を進めた。

[山本典生、中村一哉、原田勇一、浜本いつき、高橋 仁、田代真人]

11. 高いウイルス増殖効率を持つ MDCK 細胞の開発に関する研究

従来の MDCK 細胞よりもさらに高いウイルス増殖効率を示す細胞を樹立するために、I 型インターフェロン (IFN) 産生を制御する遺伝子群からなる siRNA ライブラリーをスクリーニングした結果、IRF7 を同定した。今回、同定した遺伝子に対する siRNA を導入した MDCK 細胞にウイルスを感染させ、IRF7 に対する shRNA 発現安定細胞株を樹立し、H1N1、H1N1pdm09、H3N2、B 型ウイルスを感染させた結果、コントロール細胞と比較してウイルス増殖効率が約 2~8 倍まで上昇した。[浜本いつき、田代真人、山本典生]

12. 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

ATCC から購入した MDCK 細胞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、及び EOPC の構築を行った。これらに対しがん原性試験等の安全性試験・特性試験を実施したが、特に問題点を認めなかった。以上から、この MDCK セルバンクは臨床検体からのシードウイルスの分離、リバース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]

13. シードウイルス分離用細胞としての無血清培地馴化 MDCK 細胞(MDCK-NIID)の検討

無血清培地に馴化させた MDCK 細胞(MDCK-NIID)を用いてマスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、従来から感染研にある MDCK 細胞(MDCK-C)と MDCK-NIID とで A/H3N2 ウイルス及び B 型ウイルスの分離効率、分離ウイルスの増殖性についての比較検討を行った。その結果、MDCK-NIID は MDCK-C と同等の良好なウイルス分離効率と増殖性を示した。[浜本いつき、原田勇一、中村一哉、高橋 仁、田代真人、山本典生]

14. 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。そこで本研究では、母親由来の抗体が新生児へ移行する母子免疫に注目し、母子免疫による感染防御効果に関してマウスを用いて検討した。A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8、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 マウスを雄マウスと交配し、産後母乳中に分泌される抗体応答を検討した。母乳中の抗体応答は、経鼻接種群では IgA 抗体が、皮下接種群では IgG 抗体が高い傾向にあり、産後に追加ワクチン接種を実施することで、さらにその抗体応答が増強することが明らかになった。母乳中の抗体応答は、産後 7 日目がピークとなるが、追加ワクチン接種を行うことで産後 14 日目においても高い IgG あるいは IgA 抗体応

答が維持されることが示唆された。授乳を受けた仔マウスの血中における特異的抗体は、授乳 14 日目に最も高いことが明らかになった。今後、仔マウスにおいて上昇した抗体によるインフルエンザウイルス感染に対する防御効果を検討する予定である。[相内 章、泉地恭輔 [研究生]*、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]

15. 健康人ボランティアにおける経鼻投与型インフルエンザワクチンの有効性①

経鼻インフルエンザワクチンの有効性を、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 50 名に季節性インフルエンザウイルス (A/Victoria/201/09、H3N2) の全粒子不活化ワクチン (45 µg HA/dose) を 3 週間間隔で 2 回経鼻接種し、血清ならびに鼻腔洗浄液中の中和抗体価を測定した。鼻腔洗浄液は、生理食塩水を用いて鼻腔を洗浄することで回収し、濃縮操作により生理的濃度に調整し測定に用いた。血清あるいは鼻腔洗浄液中に誘導される HI 抗体あるいは中和抗体応答は、年齢が増すにつれて減弱する傾向にあり、男性より女性で高い傾向に有ることが明らかになった。また経鼻ワクチン接種後、健康調査票により報告された局所あるいは全身性の副反応をまとめたところ鼻水・鼻づまりが多く申告されたが、喘息発作やアナフィラキシーといった重篤な副反応は認められなかった。副反応スコアが高い被験者ほど、抗体応答が低くなる傾向が示唆された。今後、詳細に検討する必要がある。 [相内 章、田村慎一*、伊藤 良 [研究生]、鈴木忠樹*、佐多徹太郎*、田代真人、長谷川秀樹* : *感染病理部]

16. 健康人ボランティアにおける経鼻投与型インフルエンザワクチンの有効性②

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経鼻接種の有効性を、健康成人ボランティアを募った臨床研究により検討した。同時に、鼻腔粘膜上へ噴霧したワクチンの流動性を抑える粘稠剤添加による効果を比較検討した。成人ボランティア計 63 名に 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、血清中の中和抗体価を測定した。2 回のワクチ

ン接種では、血清中における中和抗体価の幾何平均値 (GMT) 上昇率が低かったため、約 8 ヶ月後に追加ワクチン接種を実施した。この結果、血清中の中和抗体応答に 4 倍以上の陽転が認められ被験者の割合は約 85% となり、その GMT 上昇率は CVP 添加、非添加群でそれぞれ 33 倍、18 倍となった。免疫記憶の無い A(H5N1) ウイルスに対しても 3 回の経鼻ワクチン接種は有効であり、且つ粘稠剤の添加は抗体応答を増強させる効果があることが明らかになった。[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]

17. 細胞培養もしくは鶏卵培養で作製したインフルエンザワクチンに関する研究

発育鶏卵もしくは MDCK 細胞で分離・増殖させた A/H1N1pdm09 株および B 型株で作製した不活化ワクチンをマウスに接種し、免疫応答および防御効果を検討した。患者検体から鶏卵もしくは MDCK でウイルス分離・継代し、高い増殖性を認め、さらに抗原性の変化が認められなかった株を種ウイルスとしてワクチンを作製した。それぞれのワクチンをマウスに 2 回皮下接種後、A/H1N1pdm09 分離株で免疫した群では A/Narita 株を、B 型分離株で免疫した群では同型株を感染させ防御効果を検討した。その結果、A 型 B 型ともに鶏卵ないしは MDCK で作製したワクチンを接種した群に高い防御効果が認められ、細胞培養による防御効果に対する影響は認められなかった。また、血中の抗原特異的抗体応答を ELISA で検討した結果においても、ともに高い抗体の誘導が認められた。このことは細胞培養で作製したワクチンも、免疫誘導能および防御効果は現行の鶏卵で作製したワクチンと同等であることを示唆している。しかし、現行の SRD 試験を同一のヒツジ血清で行った場合には、A 型 B 型ともに細胞培養ワクチンの定量が困難であったため、検査法に関する問題点も明らかになった。 [浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、中内美名、佐藤佳代子、相内章、山本典生、小田切孝人、許斐奈美*、田代真人 : *日大・医]

18. インフルエンザワクチン種株の選定基準に関する検

討

インフルエンザワクチンを製造するための種株を選定する基準を、各ウイルス分離株のフェレットに対する免疫誘導能を基に構築することを目的とし、ヒト臨床検体からのウイルス分離と性状解析を行い、感染に用いるウイルス株を選択した。簡易検査で A 型陽性、PCR で H3 型陽性の鼻腔スワブより MDCK を用いて 48 検体からウイルス分離を試みたところ、45 株の分離に成功した。これら分離株を 8 代継代し、HA 価の推移を検討したところ、ほとんど変化は認められなかった。そのため、高い HA 価を示した 3 株および低い HA 価を示した 3 株、計 6 株のタンパク定量および HA 含有量を定量したところ、HA 価が異なるにも関わらず、タンパク量および HA 含有量の株間の差異はほとんど認められなかった。そのため、HA 価の高い株および低い株、それぞれ 1 株ずつ選択し、フェレットに感染させ、抗体応答を検討している。[浅沼秀樹、高橋 仁、佐藤佳代子、相内 章、山本典生、許斐奈美*、田代真人：*日大・医]

19. インフルエンザ製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響

H1N1pdm09 ウイルスに対する A/California/7/2009 (X-179A)株由来の 1 価ワクチンに関して、カナダやオーストラリアでワクチン力価の大幅な低下が見られワクチンの有効期限を短縮したとの報告があった。本研究では、ワクチンの品質管理としてワクチンの安定性に関する管理基準を作成するための知見を収集することを目的として、これまでに、X-179A 株で製造された日本の参照ワクチンや他のワクチン製造株で製造されたワクチンの SRD 力価の経時安定性や、ワクチンの主要有効成分である HA 蛋白のアミノ酸変異について調べ、X-179A 株で HA 蛋白の N129D アミノ酸変異したワクチンは SRD 力価安定性が上昇している可能性を見いだした。本年度は、X-179A 株の SRD 力価安定性に関わる要因を、発育鶏卵継代により HA 蛋白にどのようなアミノ酸変異が導入されるか、更に HA 以外の遺伝子構成による影響や蛋白凝集の点から検討したところ、X-179A 株の鶏卵馴化で起こった N129D アミノ酸変異が主要因として HA 抗原蛋白の経時安定性上昇に寄与したと示唆された。以上から、ウイルス株によってはワクチンの安定性が HA 蛋白のア

ミノ酸変異によって大きく影響を受け、インフルエンザワクチンの品質管理としてワクチンの抗原性の保持以外に、ワクチンの安定性の観点からもワクチン製造株の変異は重要な品質管理項目であることを明らかにした。[嶋崎典子、高橋 仁、矢野茂生*、藤崎誠一郎、板村繁之、田代真人：*血液・安全性研究部]

20. インフルエンザワクチンの種類の違い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コントロールする上で重要と考えられる。本年度、全粒子ワクチン及びスプリットワクチンにより誘導された抗体の質を詳細に解析し、全粒子ワクチンにより誘導された抗体は avidity の高い抗体であり、サブクラスとしては IgG2a が主になっていることが分かった。また抗血清移入実験により、全粒子ワクチンにより誘導された抗体は防御効果が高いことを確認した。このようにして得られた知見はワクチンの品質管理を行う上で、よりワクチンの効果や副反応に関連する特性を明らかにするのに役立つことが期待される。[佐藤佳代子、浅沼秀樹、板村繁之、田代真人]

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/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のレファレンスウイルスからウサギ免疫血清と不活化抗原を作製して、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 カ所の地衛研に配布した。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、そのシステムを通じて当室は地衛研からウイルスの提供を受けた。それらの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、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金 南希、佐藤彩、小田切孝人、田代真人]

2. フェレット抗血清を用いたサーベイランスキット作

製と海外への配布

A(H1N1)pdm09 卵分離株および A(H3N2)、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統の各細胞分離のレファレンスウイルスからフェレット感染血清と不活化抗原を 15 キット作製し、亜型同定と初期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。各国より本キットにて初期解析されたウイルスの提供を受け、それらについて詳細な抗原性解析、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、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、佐藤彩、金 南希、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 3 年目を迎えた。今年度は、第 2 回目 TaqMan リアルタイム PCR 検査系の外部精度評価試験 (EQA) をコア・サポート地衛研で試験的に実施し、EQA の全国展開へ向けた最終確認と全国地衛研 (79 ヶ所) における PCR 検査、株サーベイランス体制の実情把握を目的としたアンケート調査を実施した。[小田切孝人、影山努、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**、池田辰也***、川上千春****、林志直*****、滝沢剛則*****、加瀬哲男*****、田中智之*****、戸田昌一*****、千々和勝己*****、平良勝也***** : *愛知県衛生研究所、**北海道衛生研究所、***山形県衛生研究所、****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. インフルエン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/Victoria/361/2011(IVR-165)(H3N2)、B/Texas/6/2011、B/Hubei-Wujiagang/158/2009(BX-39)、B/Wisconsin/1/2010(BX-41A)、B/Wisconsin/01/2010-cell derived、A/Minnesota/11/2010(X-203)(H3N2v)、A/mallard/Netherlands/12/2000 (NIBRG-60)(H7N3)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 24 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/Victoria/361/2011 (IVR-165)(H3N2)、B/Wisconsin/01/2010(BX-41A)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、岸田典子、板村繁之、田代真人]

サーベイランス業務

1. 2012/13 シーズン国内株サーベイランス

全国の地衛研より、A(H1N1)pdm09 は 93 株、A(H3N2) は 282 株、B/Yamagata 系統は 183 株、B/Victoria 系統は 129 株の提供を受け、これら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。2012/13 シーズンの流行の主流は A(H3N2)ウイルスであった。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)分離株の 99%がワクチン株の A/Victoria/361/2011 に類似していた。Yamagata 系統についてもワクチン株 B/Wisconsin/01/10 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、菅原裕美、佐藤 彩、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金 南希、小田切孝人、田代真人]

2. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

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。2011/12 シーズンには、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 9 株、A(H3N2)分離株 290 株、B 型分離株 263 株を解析した。その結果、A(H3N2)ウイルスで、NA 蛋白に R292K 変異をもつ耐性株が 1 株検出された。R292K 耐性変異株はオセルタミビルおよびペラミビルに対する感受性が著しく低下し、ザナミビルおよびラニナミビルに対しても感受性の低下が認められた。R292K 耐性変異株は薬剤投与例から検出されており、地域への感染拡大は確認されていないが、引き続き注意深い監視が必要である。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随時一般公開し、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、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、佐藤彩、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、今井正樹、小田切孝人、

田代真人]

3. 2012/13 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。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、全国の地衛研、および独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 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。A(H1N1)pdm09 亜型は今シーズンの流行レベルが低いものの解析株は、HA 遺伝子系統樹上で A197T を持つクレード 7、または D197N, S185T を持つクレード 8 に属していた。A(H3N2)亜型は、HA 遺伝子系統樹上で全ての株が、今シーズンのワクチン株 A/Victoria/361/2011 で代表されるクレード 3C (S45N, T48I, A198S, N312S)に属した。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、多くの株がクレード 2 (P108A, S229G)に属しており、一部の株は今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 2 株からオセルタミビル耐性変異 H275Y を検出したが、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 へ登録されている。[藤崎誠一郎、金 南希、佐藤 彩、伊東玲子、小口晃央*、山崎秀司*、藤田信之*、岸田典子、徐紅、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、江島美穂、今井正樹、小田切孝人、田代真人: *独立行政法人製品評価技術基盤機構]

4. 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株の解析

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 188 株 (中国 55 株、台湾 38 株、ミャンマー 25 株、ラオス 32 株、ネパール 30 株、モンゴル 8 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。大多数の国でのインフルエンザ流行はわが国と同様、A(H3N2)が主流であり、次いで B 型、A(H1N1)pdm09 という状況であった。A(H3N2)ウイルスは A/Victoria/361/2011 参照株の血清に対する反応が 4 倍低下した株が増加傾向にあった。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/Wisconsin/1/2010 類似株が主流であった。A(H1N1)pdm09 株は、ワクチン株である A/California/07/2009 類似株であった。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、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、佐藤彩、金 南希、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

5. 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生態調査

全国 6 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。本年度は、3 件 6 株の分離報告があり、H1N1 及び H4N1 亜型の A 型インフルエンザウイルスをライブラリーに追加保存した。[高山郁代、影山 努、田代真人]

6. 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、2 件 3 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。その結果、1 件は、A/H1N2 亜型のブタインフルエンザウイルス(2 株)である事が判明し、遺伝子解析の結果、HA、NP 遺伝子は、H1 亜型ブタインフルエンザウイルスに、NA 遺伝子は、H1N2 亜型ブタインフルエンザウイルスに由来し、その他の遺伝子は A/H1N1pdm09 亜型に由来することが明らかとなり、遺伝子交雑によって新たに出現した H1N2 亜型ブタインフルエンザウイルスであると考えられた。また、もう 1 件は、

A/H1N1pdm09 亜型に由来したウイルス(1 株)である事が判明し、ブタインフルエンザウイルスあるいは鳥インフルエンザウイルスとの新たな遺伝子再集合は認められなかった。[高山郁代、高橋仁、影山努、田代真人]

7. ヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスの解析

2012 年にインドネシアでヒトから分離された 3 株の高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)をインドネシア共和国国立保健研究開発研究所(NIHRD)より入手し、全セグメントについて遺伝子解析を行った。[高山郁代、影山努]

品質管理に関する業務

1. 外部精度管理試験 (EQA) の実施

全国 11 ヶ所のコア・サポートの地方衛生研究所(地衛研)において、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)に対する EQA の第 2 回目を実施した。これは、前年度に実施した EQA の成績をもとに個々の地衛研で精度改善策を行った検査系に対する確認試験となった。2 度の EQA を実施することにより、各地衛研での RT-PCR 検査精度が格段に向上することが示されたことから、EQA プロジェクトを全国各地衛研へ展開することにより、全国的な検査レベルの向上が期待できる。次年度には全国各地衛研での EQA が計画されている。[影山 努、高山郁代、高橋 仁、中内美名、永田志保、高下恵美、小田切孝人]

2. GMP 管理区域内における新型インフルエンザワクチン候補株作製のための文書整備。

平成 21 年 4 月より、村山庁舎 9 号棟の GMP 準拠施設の稼働が開始し、新型インフルエンザワクチン株の製造およびその品質管理、安全性試験が可能になった。昨年度までに、ニワトリを用いた弱毒化確認試系の確立を行っており、この系を用いて、今年度、新たに作出した H5N1 Clade 2.1.3.2 の ワ ク チ ン 候 補 株 A/Indonesia/NIHRD11771/2013(H5N1)(NIIDRG-9) の弱毒化確認試験を行った。試験は、コントロールとして強毒株も、用いており、弱毒化確認試験手順、記録文書を実際の試験に即した形に変更、整備した。[川口晶、有田知

子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人]

3. 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

2013/2014 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。ワクチン製造所で増殖性の検討を行うため、H3N2 亜型は 5 株を試験交付し、B 型は、2 株を仮交付し、得られた資料を 2013/2014 シーズン用ワクチン株選定に供した。[川口 晶、有田知子、白倉雅之、浅沼秀樹、信澤枝里、田代真人]

4. プレパパンデミックワクチン製造候補株の輸入、増殖、検討。

インフルエンザワクチン製造用種株候補ウイルス [A/Egypt/NO3072/2010 (H5N1)(IDCDC-RG29), A/Chicken/HongKong/G9/97 (H9N2) (NIBRG-91)]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、遺伝子解析、抗原解析により、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。[有田知子、川口 晶、白倉雅之、浅沼秀樹、信澤枝里、田代真人]

5. 細胞培養型インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための GMP 関連文書整備

細胞培養型インフルエンザワクチンシードウイルス開発の一環として、GMP 管理下におけるワクチンシードウイルス作製体制を整える必要がある。本年度は GMP 管理に必要な文書整備のため、培養細胞の保管・出庫に関する手順書等の作成を行った。[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、山本典生]

6. 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、各試験の測定精度についての検討を実施した。[嶋崎典子、河野直子、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]

7. 分画試験バリデーションの実施

インフルエンザ HA ワクチンの分画試験において、4 メーカーのワクチン原液を用いて遠心条件及びショ糖溶液の組成等の条件検討を実施した。その結果、現行の 20-50(w/w%)から 20-50(w/v%)に変更することで、全粒子ワクチンとスプリットワクチンを区別可能になることを確認した。[佐藤佳代子、板村繁之、田代真人]

8. 新型インフルエンザワクチン株製造のための 9 号棟施設の GMP 準拠運用

第 9 号棟をワクチン株製造施設として稼働させるにあたり必要となる基準書や手順書について、昨年に引き続き、設備の運用方法、入退出手順、衛生管理方法について検討し、基準書、標準手順書などの文書整備及び改訂を行った。作成した文書に基づき、環境モニタリングの実施及び記録の保管、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。より充実した品質管理を行うために必要な文書整備や設備管理について引き続き検討を行っている。[佐藤佳代子、佐々木祐子*、小堺小由紀、白倉雅之、浅沼秀樹、有田知子、篠原克明**、網 康至***、信澤枝里、板村繁之、田代真人：*細菌第二部、**バイオセーフティ管理室、***動物管理室]

9. 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

2012-13 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 5 株の試験交付、A/H3N2 亜型、B 型仮交付株のべ 6 株について、抗原分析及び HA 遺伝子の遺伝子解析を実施して、ワクチン製造用株とし

での適性を確認した。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]

10. 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新規インフルエンザワクチンについて、承認前検査として当該製剤の試験検査を実施し、試験担当部室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]

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次元抗原性分析プログラムへの参加

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次元抗原性分析法 (Cartography 法) を用いて、国内分離株 764 株(H3:360 株、B 型:372 株、H1N1pdm09:32 株)の抗原解析データおよび 455 株(H3:212 株、B:219 株、H1N1pdm09:24 株)のシーケンス成績を 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、ワクチン株選定に活用された。[徐紅、岸田典子、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、佐藤 彩、金 南希、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

2. 世界インフルエンザ血清疫学専門家会議への参画

2009 年の H1pdm09 ウイルス流行時の血清疫学調査で各ラボが行った血清疫学調査の手法が統一されていなかったため、解析結果の横並びでの比較が困難であった。そこでインフルエンザ血清疫学調査手法を標準化するため CONSISE(the consortium for the standardization of influenza epidemiology)が結成された。中和試験を用いて血清学的調査を行う場合の手技の統一を図るため、

CONSISE に参加するラボ間で中和試験法を統一し、その方法に従って各ラボが試験を行った。2012 年 1 月 22 日 -23 日に香港で開催された第 3 回世界インフルエンザ血清疫学専門家会議で他の参加者と共に各ラボから出された結果を比較し、具体的な改善策について議論した。[岸田典子、小田切孝人、田代真人]

3. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスの国際的標準化のための指針の作成

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、2012 年 6 月に WHO 本部で開催された会議に出席し、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスの国際的標準化のための指針作成を行った。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 (NIC) 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、2012 年 11 月に WHO ウェブサイトにおいて公開された。[高下恵美、小田切孝人、田代真人]

4. 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画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 GISAID 機能のアップデートが順次進められている。[藤崎誠一郎、小田切孝人、田代真人]

5. WHO 関連会議および WHO インフルエンザワクチン株選定への参画

2 月に WHO ジュネーブ本部、9 月に中国 CDC でそれぞれ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。また、5月下旬にベトナムハノイ市で開催された WHO ナショナルインフルエンザセンター会議で北半球諸国のインフルエンザ流行株の性状とワクチン株、わが国の流行株の性状と薬剤耐性株検出状況を総括し報告した。[小田切孝人、今井正樹、岸田典子、徐 紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、佐藤 彩、金 南希、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]

6. 国際協力機構(JICA) ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE) 能力強化計画プロジェクトにおける研修
JICA ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)能力強化計画プロジェクトにおいて、平成24年10月15日～23日、2名の研修生に対して、インフルエンザウイルスの実験室診断法、遺伝子解析方法等に関する研修を行った。[影山 努、高山郁代、高橋 仁]

7. 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 RLs (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) の職員を対象とした研修会「Influenza virus training course in Tay Nguyen (2012年11月21日～23日)」を開催し、インフルエンザウイルスのウイルス遺伝子解析に関する技術支援を行うとともに、各研究所における鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析に関する情報共有を行った。また、高病原性鳥インフルエンザウイルスの実験室診断を安全に且つ信頼性の高いレベルで実施するため、実験室検査の詳細および地方との連携等について協議し問題解決に向けた助言を行った。[影山 努]

8. ベトナムパスツール研究所における薬剤サーベイランス技術指導
WHO/WPRO により招待され、ベトナム国ホーチミン・パスツール研究所において抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスに関する講義および技術指導を行った。

[白倉雅之、田代真人]

9. PIPBM 対象ウイルスの分与と WHO への報告

Pandemic Influenza Preparedness の対象となるウイルスに対する分与依頼に対応した。WHO の PIP フレームワークに則り、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。

[信澤枝里、田代真人]

10. 細胞培養法による種ウイルスの製造と、鶏卵培養法によるワクチン大量製造への応用に関する国際共同研究への参画

現在、国内外で細胞培養ワクチンの実用化が進められているが、少なくともしばらくの間は鶏卵培養法によるワクチン製造も並行して行われると考えられる。従って、細胞培養法により製造された種ウイルスが鶏卵を用いた大量製造法に使用可能かどうかを検証することは重要であり、多くの国の国立研究機関やワクチンメーカーによる国際共同研究が行なわれている。当センターもこの共同研究機関の一員として参画し、情報の共有を行った。[山本典生、原田勇一、高橋 仁、中村一哉、浜本いつき、板村繁之、田代真人]

11. WHO インフルエンザワクチン開発に関する国際会議への出席

平成24年1月24日～26日に香港で開催された The First WHO Integrated Meeting on development and clinical trials of influenza vaccines that induce broadly protective and long-lasting immune responses に参加し、経鼻インフルエンザワクチンに関するこれまでの成果を発表すると同時に意見交換を行った。[相内 章、長谷川秀樹*、田代真人：*感染病理部]

12. 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]

研修業務

1. インフルエンザの実験室診断についての研修

ベトナム国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE) から研究員2名を平成24年10月22日から11月2日まで受け入れ、インフルエンザウイルスの分離・培養で使われる MDCK 細胞の維持管理法やウイルスの分離法など、インフルエンザ株サーベイランス、遺伝子検査などに関する技術研修を行なった。[今井正樹、徐 紅、岸田典子、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金 南希、佐藤彩、江島美穂、小田切孝人、田代真人]

2. 平成 24 年度国立感染症研究所医師卒後臨床研修および連携市民セミナーでの研修

7月3日に感染研で実施された連携市民セミナーおよび10月24日に実施されたH24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. 平成 24 年度ウイルスコースにおける赤血球凝集抑制試験のための技術研修

平成24年10月17日にウイルスコースに招聘された地衛研職員に赤血球凝集抑制試験について技術研修を行った。[小淵正次*、今井正樹、岸田典子、伊東玲子：*富山県衛生研究所]

4. 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16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 検査を中心とした A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法および検査における精度管理に関する診断検査技術研修を行った。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、高山郁代、高橋 仁]

5. 地方衛生研究所への高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)同定技術研究会の実施

全国76カ所の地方衛生研究所の検査担当職員を感染研に招聘し、リアルタイム RT-PCR 検査を中心としたインフルエンザウイルスの亜型同定法および検査における精度管理に関する診断検査技術研究会を開催した。また、高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)同定時に、陽性コントロールのコンタミネーションを区別することができるマーカー入りの H5N1 検出用陽性コントロールおよび陽性コントロール識別用プローブの配布を行った。研究会では、各所で実施している検査方法について全体討議や個別相談を行い、連携の強化が図られた。[影山努、高山郁代、高橋 仁、白倉雅之、中村一哉、小田切孝人、今井正樹、岸田典子、藤崎誠一郎、高下恵美、徐 紅]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) N. Kishida, S. Fujisaki, M. Yokoyama, H. Sato, R. Saito, H. Ikematsu, H. Xu, E. Takashita, M. Tashiro, S. Takao, T. Yano, T. Suga, C. Kawakami, M. Yamamoto, K. Kajiyama, H. Saito, S. Shimada, S. Watanabe, S. Aoki, K. Taira, M. Kon, J. Lin and T. Odagiri, Evaluation of influenza A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of post-vaccination human serum antibodies against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol.19, No.6, June 2012
- 2) S. Fujisaki, E. Takashita, M. Yokoyama, T. Taniwaki, H. Xu, N. Kishida, H. Sato, M. Tashiro, M. Imai and T. Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 429,51-56,2012
- 3) E. Takashita, Y. Muraki, K. Sugawara, H. Asao, H. Nishimura, K. Suzuki, T. Tsuji, S. Hongo, Y. Ohara, Y. Kawaoka, M. Ozawa

- and Y.Matsuzaki. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. *Journal of Virology*, 86,13108-13111,2012
- 4) Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System. Collaborators; Ian Barr, Aeron Hurt, Anne Kelso, Patrick Reading, Seng Ly, Heng Seng, Philippe Buchy, Sam An Ung, Yuelong Shu, Cuiling Xu, Zhen Xu, Dayan Wang, Mike Kama, Prem Singh, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Sibounhom Archkhawongs, Bouaphanh Khamphongphanh, Phengta Vongphrachanh, Chong Chee Kheong, Norizah Ismail, Alexanderyn Burmaa, Badarchiin Darmaa, Pagbajabyn Nymadawa, Jean-Paul Grangeon, Ann-Claire Gourinat, Qiu Sue Huang, Liza D Lopez, Juan M Lopez, Remigio M Olveda, Vito Roque, Lance Jennings, Chun Kang, Cui Lin, Raymond Lin, Wen Sim Nancy Tee, Amanda Balish, Andrew Corwin, Bryan K Kapella, Paul Kitsutani, Jeffrey McFarland, Ann Moen, Xiyuan Xu, Vu Mai Hoang, Ngoc Long Long, Le Quynh Mai, Le Khanh Hang Nguyen, Hoang Anh Nguyen, Thanh Long Nguyen, Thu Ngoc Nguyen, Nima Asgari, Akanisi Dawainavesi, Emma Jane Denehy, Maria Nerissa Dominguez, Mendsaikhan Jamsran, Takeshi Kasai, Jacob Kool, Hannah Lewis, Dapeng Luo, Babatunde Olowokure, Jeffrey Partridge, Boris Pavlin, Gina Samaan, Harpal Singh, Reiko Tsuyuoka, Apaitia Vakacegu, Wenqing Zhang. Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. *PLoS One*, 7:e37568, 2012
- 5) Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2013;188(1-2):73-5.
- 6) Imai M., Watanabe S. and Kawaoka Y. The Cytoplasmic Tail Domain of Influenza B Virus Hemagglutinin Is Important for Its Incorporation into Virions but Is Not Essential for Virus Replication in Cell Culture in the Presence of Compensatory Mutations. *J Virol* 86: 11633-11644, 2012.
- 7) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokot. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65: 19-27 (2012)
- 8) Sriwilaijaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.* 94(2):139-46 (2012)
- 9) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. *ACS Chem Biol.* 16;7(3): 552-62 (2012)
- 10) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 84(2): 336-44 (2012)
- 11) Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine.* 30(45):6461-71 (2012)
- 12) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious

- clone. *J Virol.* 86(19):10805-10820, 2012
- 13) Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-2011. *Virus Research*, 170 (1-2), 109-117, 2012
- 14) Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, Nobusawa E. Composition of Hemagglutinin and Neuraminidase Affects the Antigen Yield of Influenza A(H1N1)pdm09 Candidate Vaccine Viruses. *Jpn J Infect Dis*, 66, 65-68, 2013
- 15) Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. *PLoS One*. 2013;8(3):e59892.doi:10.1371/journal.pone.0059892. Epub 2013 Mar 26.
- 16) Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 Suppressive Sequences Are Modulated by Rev Transport of Unspliced RNA and Are Required for Efficient HIV-1 Production. *PLoS One*. 2012;7(12):e51393.
- 17) Chang MO, Suzuki T, Yamamoto N, Watanabe M, Takaku H. HIV-1 Gag-virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells through IFN- α -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F. *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):579-90.
- 18) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol.* 2012 Jun;61(Pt 6):820-9.
- 19) S. Okada, S. Hasegawa, H. Hasegawa, A. Ainai, R Atsuta, K. Ikemoto, K. Sasaki, S. Toda, K. Shirabe, M. Takahara, S. Harada, T. Morishima, T. Ichiyama. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013 Aug;63(2):194-200.
- 20) Sasaki, K. Hoshino, T. Sugiyama, C. Yamazaki, T. Yano, A. Iizuka, H. Hemmi, T. Tanaka, M. Saito, M. Sugiyama, Y. Fukuda, T. Ohta, K. Sato, A. Ainai, T. Suzuki, H. Hasegawa, N. Toyama-Sorimachi, H. Kohara, T. Nagasawa, T. Kaisho. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Dec 6;120(24):4733-43.
- 21) E. van Riet, A. Ainai, T. Suzuki, H. Hasegawa. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900.
- 22) Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals.* 40(1): 96-99, 2012
- 23) Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiko Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418: 38-43 (2012)
2. 和文発表
- 1) 今井正樹、河岡義裕：高病原性鳥インフルエンザウイルス—僅かな遺伝子変異で哺乳類間感染 *Medical Science Digest*, 38: 378-379, 2012
- 2) 今井正樹、河岡義裕：哺乳類間を空気伝播する H5 インフルエンザウイルス インフルエンザ診療ガイド 2012-13,pp.36-37, 2012
- 3) 今井正樹、河岡義裕：哺乳類間で空気伝播する高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス 臨牀と研究 89: 1617-1622, 2012
- 4) 小田切孝人：WHO のインフルエンザワクチン株の選び方 *インフルエンザ* 13(2):41-47,2012
- 5) 小田切孝人：インフルエンザワクチン株の選定法とワクチンが抱えている問題、改善へ向けた将来展望 *小児科* 53(10):1355-1365,2012
- 6) 今井正樹、河岡義裕：高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスはパンデミックを起こすか *インフル*

エンザ, 14: 37-43, 2013

- 7) 高下恵美、田代真人：オセルタミビル耐性は存在するか 感染症道場 2,38-41,2013
- 8) 影山 努：インフルエンザ診断における進歩 臨床とウイルス 40(4):201-208, 2012
- 9) 大場邦弘、影山 努：インフルエンザウイルス型・亜型同定検査－既存の検査法と新規マイクロ流路チップを用いたポイント・オブ・ケア遺伝子検査法の臨床的有用性の比較について 小児科臨床, 65(12):2635-2641, 2012
- 10) 山本典生、田代真人：細胞培養インフルエンザワクチン BIO Clinica, 28(4):41-45, 2013
- 11) 山本典生：細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティと GMP. クリーンテクノロジー, 22(7):1-5, 2012
- 12) 篠原 克明、嶋崎 典子：バイオハザード対策用防護服材料の性能評価 クリーンテクノロジー, 22(6):58-64,2012

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

- 1) Imai M, Antiviral-resistant B viruses with novel mutations detected by antiviral resistance surveillance in Japan. Sixth Meeting of National Influenza Centres and Influenza Surveillance in the Western Pacific and South-East Asia Regions, Hanoi, Vietnam, June 2012.
- 2) T. Odagiri, Influenza activity in the northern hemisphere. Sixth Meeting of National Influenza Centres in the Western Pacific and South-East Asia Regions. Hanoi, Viet Nam, June 2012
- 3) E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, N.Kim, A.Sato, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, M.Tashiro and T.Odagiri, Detection of antiviral-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Japan by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays. 3rd International Influenza Meeting 2012, Munster, Germany, September 2012
- 4) E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, N.Kim, A.Sato, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi,

M.Tashiro and T.Odagiri Detection of Antiviral-resistant Influenza Viruses in Japan from 2008-2009 to 2011-2012 Influenza Seasons. 2nd isirv Antiviral Group Conference, Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, Hanoi, Viet Nam, October 2012

- 5) Itsuki Hamamoto, Hiroshi Takaku, Masato Tashiro, Norio Yamamoto, High Yield Production of Influenza A Virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Cells with Stable Knockdown of IRF7. 4th Influenza Vaccines for the World - IVW 2012, Valencia, Spain, October 2012
 - 6) A. Ainai, S. Tamura, T. Suzuki, E. van Riet, R. Ito, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Kurata, H. Hasegawa, Neutralizing antibody response in nasal mucus and serum of healthy adults after intranasal vaccination with inactivated whole influenza virus vaccine. The 9th Japan-China International Conference of Virology, Sapporo, June 2012
 - 7) H. Asanuma, A. Ainai, M. Obuchi, T. Odagiri, M. Shirakura, E. Nobusawa, T. Sata, H. Hasegawa, M. Tashiro, Alteration of infectivity and antigenicity by host adaptation of the first Japanese A/H1N1pdm09 isolate. 3rd International Influenza Meeting, Muenster, September 2012
 - 8) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. The 6th Orthomyxovirus Research congress, Bromont, Canada
- ### 2. 国内学会
- 1) 江島美穂、高下恵美、藤崎誠一郎、金南季、佐藤彩、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、今井正樹、田代真人、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 3 シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスサーベイランス、第 26 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 福島、2012 年 5 月
 - 2) 小田切孝人：インフルエンザ A(H3N2)および B 型ワクチンが抱えている問題点、第 26 回インフルエンザ

- 研究者交流の会シンポジウム 福島、2012年5月
- 3) 川上千春、七種美和子、江島美穂、高下恵美：長期持続感染例のウイルス変異、第26回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 福島、2012年5月
 - 4) 今井正樹：新型インフルエンザの出現機序について、第22回感染研シンポジウム 東京、2012年5月。
 - 5) 藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇 妙、徐 紅、岸田典子、横山 勝、佐藤裕徳、江島美穂、金 南希、佐藤 彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人：新しい薬剤耐性変異を持つB型インフルエンザウイルスの性状、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 6) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人：全国地方衛生研究所3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60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 7) 岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金 南希、佐藤 彩、江島美穂、小口晃央、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 2011/12シーズンのインフルエンザ流行株と平成24年度のワクチン株、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 8) 川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代真人：免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄されたA(H3N2)インフルエンザウイルスの解析、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 9) 今井正樹、渡辺真治、河岡義裕：B型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)の細胞質領域はHAのウイルス粒子への取り込みにとって重要である、第60回日本ウイルス学会総会 大阪、2012年11月
 - 10) 小田切孝人、岸田典子、徐 紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人：孵化鶏卵分離、馴化にともなうインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点、第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012年11月
 - 11) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析、第16回日本ワクチン学会 横浜、2012年11月
 - 12) 今井正樹、河岡義裕：インフルエンザウイルスのヘマグルチニンのレセプター認識特異性に関わる新規アミノ残基の同定、第35回日本分子生物学会年会 福岡、2012年12月
 - 13) 高下恵美：新規抗インフルエンザ薬に対する耐性ウイルス検出系の構築、Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月
 - 14) 小田切孝人、岸田典子、徐 紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、田代真人：インフルエンザワクチン株の卵馴化による2012/13シーズンワクチンの効果におよぼす影響およびブタ由来A/H3N2 variant (v)ウイルスに対する邦人の抗体保有状況、Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月
 - 15) 大場邦弘、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診断の臨床的検討、第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会 東京、2012年10月
 - 16) 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、第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会東京、2012年10月
 - 17) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘：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診断法の開発、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 18) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山努：蛍光標識プライマーを用いたDirect RT-LAMP法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月
 - 19) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内 章、長谷川秀樹、田代真人：細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響、第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月

- 20) 浜本 いつき、原田 勇一、中村 一哉、高橋 仁、許斐 奈美、浅沼 秀樹、田代 真人、山本 典生：無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 21) 原田 勇一、高橋 仁、中村 一哉、浜本 いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐 奈美、浅沼 秀樹、板村 繁之、田代 真人、山本 典生：インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 22) 高橋 仁、原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村 繁之、田代 真人、山本 典生：インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 23) 井戸栄治、Jacob Barnor、Yaw Amoah、Ishmael Aziati、Ntim Afia、James Brandful、William Ampofo、Samson Ofori、山本典生、石川晃一、Alexander Nyarko、山岡昇司：ガーナ国コフォリデュア州立病院における現行 ART の有効性に関する評価研究、第 26 回日本エイズ学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 24) 信澤枝里、中内美名、松寄葉子、菅原勘悦、有田知子、廣津伸夫、田代真人、西村秀一：A/H1N1pdm09 ワクチン被接種者血清抗体が認識する HA 上の抗原領域の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 25) 松寄葉子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、信澤枝里：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 26) 嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 27) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 28) 有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人：H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 29) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹：経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 30) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠樹、田村慎一、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹：基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月
- 31) 山崎 達也、二宮 大輔、長島 麻里亜、荒井 由佳、手嶋 保智、長谷川 秀樹、相内 章、藤本 陽、千葉 丈：インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究 ～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 32) 浅沼 秀樹、相内 章、佐藤 佳代子、許斐 奈美、岸田 典子、長谷川 秀樹、山本 典生、田代 真人：野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 33) R. Nakao, D. Bai, M. Ohnishi, H. Uematsu, A. Ainai, H. Hasegawa, H. Senpuku : Humoral immunity against Porphyromonas gingivalis in mice intranasally vaccinated with combination of outer membrane vesicles and synthetic double stranded RNA、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 34) H. Hasegawa, A. Ainai, T. Suzuki, S. Tamura, M. Tashiro, T. Kurata : Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 35) E. van Riet, A. Ainai, R. Ito, K. Senchi, T. Suzuki, S. Tamura, M. Tashiro, H. Hasegawa : Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月
- 36) 相内 章、池田 千将、伊藤 良、鈴木 忠樹、泉地 恭輔、田村慎一、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹：

感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜、2012 年 11 月

- 37) K. Sato, Y. Takahashi, M. Ato, H. Asanuma Split-virion influenza vaccines induce high levels of virus-specific antibodies at the booster immunization. 第 41 回日本免疫学会学術集会 神戸、2012 年 12 月