

201225001B

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の  
解析に関する研究

平成 22 年～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 信澤枝里

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の  
解析に関する研究

平成 22 年～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 信澤枝里

平成 25(2013)年 3 月

## 目 次

平成 22 年～24 年度

I	総括研究報告書	
	新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究	P. 1
	研究代表者：信澤枝里	
II	分担研究報告書	
1.	病原性及び重症化要因の解析	P. 24
	—気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析—	
	研究分担者：長谷川秀樹	
	研究協力者：川口 晶、鈴木忠樹、佐藤由子	
2.	ヒト抗体による新型ウイルス HA 上の抗原領域の認識機構の解析	P. 35
	研究分担者：信澤枝里	
	研究協力者：中内美名、高橋宜聖、西村秀一、松寄葉子、菅原勘悦、廣津伸夫、萩原温久	
3.	新型インフルエンザ H1N1 の HA 分子の抗原構造の解析	P. 41
	研究分担者：松寄葉子	
	研究協力者：菅原勘悦	
4.	新型インフルエンザウイルスを認識するモノクローナル抗体の作製	P. 47
	研究分担者：高橋宜聖	
	研究協力者：阿戸 学、小林和夫、信澤枝里、西村秀一、萩原温久、築地 信	
5.	新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析	P. 53
	研究分担者：西村秀一	
6.	インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究	P. 59
	研究分担者：田中成典	
	研究協力者：福澤 薫、尾曲克己、中島捷久、牛尾律子	
7.	HA 抗体複合体構造解析に向けた研究	P. 63
	研究分担者：安武義晃	
	研究協力者：鈴木忠樹、川口 晶	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	P. 70

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
総合研究報告書(H22～24年度)

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

研究代表者 信澤枝里 (国立感染症研究所 室長)

**研究要旨** 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm09 (新型ウイルス)の病原性および抗原性に関し網羅的解析を行い、3年間の研究の結果、下記の成果を得るに至った。

新型ウイルス感染による重症化例はアレルギー疾患に関連する症例が多い。しかし、その病態形成の機序については全く研究が進んでいない。そこで、新型ウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環としてアレルギー素因を有する近交系マウス NC/Nga を用いて、病態形成機序の解明を試みた。その結果、新型ウイルス感染後、喘息発作を誘導することで病態悪化を引き起こす動物モデルの作製に成功し、重症化要因の解明に寄与した。また、このモデルはインフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新しいモデルとしても有用と考えられる。

新型ウイルスは従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1(季節性ウイルス)とは抗原性が異なるが、新型ウイルスヘマグルチニン(新型 HA)に対する抗体のエピトープ構造の詳細は明らかにされていない。一方で、新型ウイルスは旧 H1 ウイルスとは異なる特異的な抗体を惹起することが示唆されている。本研究では HA の抗原構造の詳細解析、ヒトの新型 HA に対する免疫応答やその抗体のエピトープ構造を明らかにし、今後予想される抗原変異の予測、流行規模の推定にも資する情報を提供することを目的とした。(1) 新型ウイルス A/Narita/01/2009 に対するマウス単クローン抗体(mAb)エスケープ変異株を分離、解析し、旧 H1HA とは異なる新型 HA の抗原構造を明らかにした。(2) 新型ウイルスワクチン接種者が産生する血清中和抗体の結合領域と中和活性を持つ抗体の認識部位を明らかにした。(3) ワクチン接種者の末梢血由来のウイルス結合性記憶 B 細胞やプラズマ細胞から迅速にウイルス結合性 mAb を作製する実験系を確立した。得られた抗体の解析から新型ウイルスは交叉結合性抗体の産生を促すことが示唆された。(4) 2009 年～2011 年にかけて、新型ウイルス感染あるいはワクチン接種を受けた約 500 名を対象に、新型ウイルスに対する免疫応答を HI 抗体価から検討した。その結果、HI 価無／低免疫応答を示したグループが約3割存在し、中和抗体価を示すものもいたが、一方で、新型ワクチン以外のワクチンに対しても低い免疫応答を示す集団が多いことが明らかになった。

ウイルス感染、抗原抗体反応の全てが原子間相互作用に基づいている。そこで、ウイ

ルスが変異した際、その影響を原子間相互作用の解析から評価する系として、計算機実験と結晶構造解析の系の構築を試みた。(1)古典力学的な分子動力学法およびフラグメント分子軌道法に基づき高速高精度の計算機シミュレーションを行い、HA 複合体におけるアミノ酸残基の分子認識に関わる情報を取得した。(2)X 線結晶解析及び高速原子間力顕微鏡により、*新型ウイルス* HA-mAb 複合体のアミノ酸残基間の相互作用の解析系の確立を試みた。

## 研究分担者

信澤枝里 国立感染症研究所 室長  
長谷川秀樹 国立感染症研究所 部長  
高橋宜聖 国立感染症研究所 室長  
西村秀一 国立病院機構仙台医療  
センター 室長  
田中成典 神戸大学 教授  
松寄葉子 山形大学 准教授  
安武義晃 独立行政法人 産業技術  
総合研究所 研究員

## A.研究目的

新型ウイルス感染では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向が指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかにされた。しかし、その病態形成の機序に関しては、全く明らかにされていない。そこで、本研究では、気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態形成の機序を解明することを病原性解析の目的とした。

新型ウイルスの主要抗原 HA は旧 H1HA とは抗原性が異なるが、その詳細な抗原構造は明らかにされていない。また、新型ウイルスワクチン接種／罹患に対する免疫応答は、旧 H1 ウイルスに対する応答とは異なり、交叉反応性を示すことが示唆されている。一方、新型ワクチン接種、

新型ウイルス感染に対するヒトの免疫応答、特に低/無免疫応答群に関する情報は少ない。今後の抗原変異に対応するためにも、新型ウイルスの抗原構造とそれに対するヒトの免疫応答機構を解析し国民の健康被害を最小限に留め、今後のワクチン行政にも資する情報を提供することを目的とした。そこで、本研究ではマウス単クローナル抗体 (mAb) エスケープ変異株を用いた新型ウイルス HA の抗原領域地図の作成、新型ウイルスワクチン接種及び罹患に対するヒトの免疫応答や産生される抗体のエピトープ構造の詳細解析を行った。さらに HA 複合体における原子間相互作用から HA に生じた変異の影響を推定し、抗原変異予測に資する情報を提供する系として、計算機実験系、X 線結晶構造解析系の確立を試みた。

## B.研究方法

### ○病原性の解析

気管支喘息モデルマウスを構築し、ウイルス感染と喘息誘導のタイミング、肺洗浄液中のウイルス量、炎症細胞浸潤、ケモカイン産生等を検討し、重症化に関わる要因の検索を行った。

### ○抗原性の解析

#### ◎抗原構造の解析:

新型ウイルス A/Narit/1/2009HA に対する 16 種類のマウス mAb を用いて、計 800 株のエスケープ変異株を分離後、

変異部位を同定した。また、各変異株と各 mAb との反応性を血球凝集抑制試験 (HI 試験) により検討した。

◎ヒト抗体による*新型ウイルス*抗原構造認識機構の解析:

・*新型ウイルス*ワクチン接種後の約 150 名のヒト血清を対象に、結合実験、HI 試験を行い、ヒト血清抗体が結合、認識する HA 上の抗原領域を同定した。・*新型インフルエンザ*ワクチン接種者の抹消血プラズマ細胞、記憶 B 細胞から*新型ウイルス*結合性 mAb を作製する系を確立し、16 種類の mAb を作製し、その結合能の解析を行った。

◎*新型ウイルス*に対するヒトの免疫応答の解析:

*新型ウイルス*ワクチン接種者及び感染者のペア血清を用いて中和抗体価、CF 抗体価の測定および*新型ウイルス*ワクチン以外のワクチンに対する HI 抗体価の測定を行った。

○*新型 HA* タンパク複合体の構造解析:

・分子動力学法、フラグメント分子軌道法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、HA 複合体内のアミノ酸間の相互作用や熱力学的安定性に関する解析を行った。

・*新型ウイルス HA* および HA-抗体複合体の結晶構造解析を行うため、*新型ウイルス HA* の調整、結晶化条件の検討および高速原子間力顕微鏡 (AFM) を利用した抗原抗体相互作用の観察を行っ

た。

(倫理面への配慮)

動物を用いた感染実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。ヒト由来試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### (1) 気管支喘息モデル動物における*新型インフルエンザウイルス*感染の病態解析

気管支喘息モデルの作製を行い、*新型ウイルス*感染と喘息誘発の時期的タイミングの差で重症化の有無が左右されることを明らかにした。また、肺洗浄液中の*ウイルス*量、炎症性細胞浸潤、炎症性サイトカイン、喘息発作関連ケモカインの産生量の解析から肺におけるケモカイン量の増加が重症化要因となることが示唆された。

### (2) *新型ウイルス HA* 分子上の抗原構造の解析

800 株のエスケープ変異株の解析から、*新型 HA* の抗原領域として、旧 H1HA の Sa, Sb, Ca2 領域に加え、147 位を中心とした新たな抗原領域の存在を明らかにした。このほか、*新型 HA* では、Sa, Sb 領域が 3 残基を共有して重なっているという特徴も示した。

### (3) ヒトの血清抗体が認識する*新型ウイルス*抗原上の抗原構造の解析

新型ウイルスワクチン接種者のうち、接種後 HI 抗体価が 160 以上で新型 HA の HA1 領域に特異的に結合した約 40 人の血清を対象とした。その結果、旧 H1HA とは異なる新型 HA 特異的な約 7 割の血清が Sa + Sb, Ca2 領域を認識し、その大半の血清は Sa, Sb, Ca1, Ca2 のうち複数の抗原領域を認識した。認識部位の中には、流行株で変異が同定されている 158 位や新型 HA 特異的抗原領域形成残基 147 位が含まれていた。

#### (4) 新型ウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

ワクチン接種者の末梢血からウイルス結合性記憶 B 細胞を単離・同定する新たな系を開発した。さらに、他のグループが報告している系と組み合わせ、抹消血記憶 B 細胞、プラズマ細胞それぞれから迅速にウイルス結合性 mAb を作製する系を構築した。この系により、各々 2 種類、14 種類のヒト mAb の作製に成功し、このうち 4 種類は交叉結合性を示すことが明らかとなり、*新型ウイルス*により惹起される抗体の特異性が示された。

#### (5) 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

新型インフルエンザワクチン接種者で、低/無反応者を対象に、その年齢層、*新型ウイルス*ワクチン以外のワクチンに対する反応性を検討した。その結果、免疫応答の低い集団は 50 歳代から増

加すること、複数回ワクチン接種によっても HI 抗体価の上昇は見られないこと、季節性インフルエンザワクチン H3N2 株、および B 型肝炎ワクチンに対しても、調べた血清の 7-5 割で、免疫応答が低い傾向が確認された。

#### (6) 新型 HA タンパクの構造解析:

◎ HA-レセプター複合体、HA-抗体複合体内のアミノ酸残基間の相互作用の解析を、定量的かつ効率的に進める手法としてフラグメント分子軌道法、分子動力学法を用いて行った。その結果、新型 HA とレセプターとの結合あるいは結合特異性に拘る重要残基の同定、実験からは判断できない HA-抗体間のアミノ酸間の結合の生成・消失に関する情報を得た。

#### ◎ HA-抗体複合体の構造解析

HA-抗体複合体の結晶化のため可溶化 HA の回収条件の確立、HA-Fab 複合体を用いた結晶作製及び X 線回折の条件検討、高速原子間力顕微鏡を用いた複合体の解析等を行った。が、結晶化に必要な量の新型 HA の確保には至らなかった。また、抗体単独での結晶化は成功したが、結晶が微細で構造解析に用いる得る質の回折データの取得には至らなかった。一方、高速原子間力顕微鏡を用いて HA-mAb 複合体形成の観察には成功した。

#### D. 考察



### (1)気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

Nc/Nga マウスを用いた実験結果から、*新型ウイルス*感染と喘息発作誘導という二つの事象が起きる時間的差が、症状の増悪の有無を左右し、感染後の喘息発作誘導により重症化が引き起こされることが明らかとなった。また、この重症化には種々のケモカインが関与していることも示唆した。これまで、喘息モデル動物にインフルエンザウイルスを感染させる研究は行われているが、インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化モデルは報告されていない。本モデルは、インフルエンザウイルス感染と喘息発作の関連を解析する新たな動物モデルとなる。

### (2)新型ウイルスHA 分子上の抗原構造の解析

16 種類の mAb を用いて多数のエスケープ変異株を分離、解析したことで、従来明らかにされていなかった詳細なエピトープ構造を明らかにできた。Sa, Sb 領域の重なり、同じ部位における異なるアミノ酸変異の影響、新たな抗原領域の同定は、適切な mAb とエスケープ変異株の組み合わせがなければ同定できず、今回、提示した抗原領域地図を基に、mAb を活用することで流行株の変異が抗原性に与える影響の推定が可能になり、今後の *新型ウイルス*の抗原変異の解

析に大きく寄与すると考える。

### (3)ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

インフルエンザウイルスの抗原変異はヒト血清による変異株の選択によるが、本研究の結果、*新型ワクチン*接種により惹起された抗体が認識するエピトープ構造は、かなり複雑であることが示された。また、血清が認識する抗原領域、アミノ酸残基の解析の結果、*新型ウイルス*流行株に生じた変異は、*ワクチン*接種者の血清抗体により選択されて生じた可能性が示唆された。本研究では、血清抗体が認識するエピトープ構成アミノ酸残基やその部位を認識するヒト血清の割合を明らかにすることで、抗原変異予測、流行規模の推定が可能になることを示した。

### (4)新型ウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

近年、単一のヒトB細胞から、抗体V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発され、インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体の特性が明らかにされつつある。本研究では、他のグループが開発した方法に加え抹消血の記憶B細胞から抗体遺伝子をクローニングしmAbを作製する系も確立し、*新型ウイルス*ワクチン接種後に惹起されたヒトmAbの迅速作製システムの構築に成功した。作製したmAb中に交叉結合性を示す抗体を同定しており、*新型ワクチン*接種に対する

免疫応答が旧H1 ウイルスに対する反応と異なり特異的であることを示した。今後、構築したmAb作製系を用いてワクチン接種、罹患により惹起されるヒト抗体のエピトープ構造の詳細解析を行う。

#### (5) 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

新型ウイルスワクチン接種後あるいは罹患後に、低/無 HI 抗体価を示す集団を対象に免疫応答に関して解析を行った。その結果、これまで高齢者で比較的免疫応答が低いことが指摘されていたが、50 歳代、小児にも免疫応答の低い集団の存在が確認された。また、このような集団で、新型インフルエンザワクチン以外の季節性インフルエンザワクチン(H3N2)、B 型肝炎ワクチンに対する抗体価を調べると、やはり半数近くで低い免疫応答を示した。本研究の結果、低免疫応答の低い集団に対しても効果を発揮できるワクチン開発の必要性が顕示された。今後のワクチン株の開発には、流行株の抗原性のみならず、本研究で行った各人の免疫応答の詳細解析の情報が重要であると考えられる。

#### (6) 新型 HA タンパクの構造解析:

◎HA の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

本研究で行った分子動力学法とフラグメント分子軌道法を用いた高精度計算機シミュレーションにより、HA 複合体内の分子間相互作用の定量的解析が可能と

なり、実験と合わせて相互補完できる手法として確立が可能となった。今後、さらに精度を上げることでアミノ酸変異の影響を評価する系としてインフルエンザウイルスの抗原変異、レセプター結合特異性に関する研究に応用が可能になる。

#### ◎HA-抗体複合体の構造解析

新型ウイルス HA のウイルス粒子からの切り離しが非常に困難で、結晶化に必要な量の回収には至らなかった。本研究ではウイルス粒子上の HA の構造を重視し、バキュロウイルスを用いた組換え HA の大量生産は試みなかったが、今後、結晶学的研究を行うには組換え HA の使用も視野に入れる必要があると考える。一方、少量のサンプルで観察可能な高速原子間力顕微鏡実験を行い、抗原抗体複合体の画像を捉えることに成功した。今後、この手法と結晶構造解析法との組み合わせにより、詳細な HA 複合体構造の解析に寄与できると考える。また、X-線結晶解析手法の確立に際し、副産物として得られた Aichi/68 株 HA の構造は、糖鎖を伴った新たな構造で、今後、他の HA でも糖鎖を含めた構造解析が可能になれば、抗体による認識を妨害する糖鎖の同定などへの応用が期待できる。

#### E. 結論

◎アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いて新型インフルエンザウイルス

感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築、解析し、病態形成機序を明らかにした。

◎**新型ウイルスHA**の抗原領域地図を作成し、**新型HA**特異的抗原構造の詳細を明らかにした。

◎**新型ウイルスワクチン**接種者の血清抗体が認識する**新型HA**抗原領域の詳細構造を明らかにした。

◎**プラズマ細胞**の抗体遺伝子から**モノクローナル抗体**を作製することに成功し、その中に、いくつかの交叉結合性を示す抗体を同定した。

◎**新型ウイルスワクチン**接種および感染に対し、**低/無HI**抗体価を示す集団の多くが、**季節性インフルエンザワクチン**、**B型肝炎ワクチン**に対しても**低反応性**を示すことが明らかになった。

◎**分子動力学(MD)**法と**フラグメント分子軌道(FMO)**法を用いた高精度計算機シミュレーションを行うことで、**HA複合体**内の分子間相互作用の定量的解析が可能であることを示した。

◎**結晶構造解析法**と**高速原子間力顕微鏡実験**の組み合わせにより、**抗原-抗体**相互作用の詳細な解析が可能であることを示した。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. The HA and NA affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID*. 66(2013) pp.65-68.
2. 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 2010-11. *Virus Res*. 170(2012) pp.109-117.
3. Eri Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiology and Immunology*. 56 (2012) pp. 99-106
4. Akio.Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody

- Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) pp. 1197-1202.
5. Akio. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", *J. Mol. Graph. Model.* 30 (2011) pp. 110-119.
  6. Kaori Fukuzawa, Katusmi Omagari, Katsuhisa Nakajima, Eri Nobusawa, Shigenori Tanaka. Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1 virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin. *Protein and Peptide letters.* 18, 530-539, 2011
  7. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
  8. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
  9. Van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections: thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
  10. 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.* 2012 Jan 13.

11. 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*. 2012 Feb;84(2):336-44.
12. Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
13. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.
14. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Aina A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. *Jpn J Infect Dis*. 2011 Jan;64(1):40-9.
15. Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin*. 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
16. Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2010

- Oct;82(10):1754-61.
17. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*. 2010 Apr 23;5(4):e10256.
  18. Yanagibashi, T., A. Hosono, A. Oyama, M. Tsuda, A. Suzuki, S. Hachimura, Y. Takahashi, Y. Morose, K. Itoh, K. Hirayama, K. Takahashi, and S. Kaminogawa. 2012. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA<sup>+</sup> B cells. *Immunobiology* Aug 8, Epub ahead of print
  19. Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky, and T. Takemori. 2012. Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.*, 209: 2079-2097.
  20. Onodera, T., Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama, S. Hachimura, T. Kurosaki, and K. Kobayashi. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 2485-2490
  21. Ohnishi, K., Y. Takahashi, N. Kono, N. Nakajima, F. Mizukoshi, S. Misawa, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, S. Fu, N. Hirayama, M. Ohshima, M. Ato, T. Kageyama, T. Odagiri, M. Tashiro, K. Kobayashi, S. Itamura, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2012. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65: 19-27.
  22. Yuki, N., Y. Takahashi, T. Ihara,

- S. Ito, T. Nakajima, K. Funakoshi, K. Furukawa, K. Kobayashi, and M. Odaka. 2012. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. *J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry* 83: 116-117.
23. 小野寺大志 小林和夫 高橋宜聖 臨床免疫・アレルギー科(科学評論社) B細胞内因性 TLR シグナルによる B細胞応答の制御機構、58、275-282、2012
24. Harada, Y., A. Ninomiya-Mori, Y. Takahashi, M. Shirakura, N. Kishida, T. Kageyama, Y. Tada, M. Tashiro, and T. Odagiri. 2011. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*, 29: 8330-8337.
25. Fujii, H., M. Ato, Y. Takahashi, K. Otake, S. Hashimoto, T. Kaji, Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Fujita, A. Adachi, T. Nayakaya, M. Taniguchi, S. Koyasu, and T. Takemori. 2011. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*, 23: 433-441.
26. 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫「ウイルス感染局所における記憶 B細胞応答」実験医学増刊、29、81-86、2011
27. Kurosaki, T., Y. Aiba, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Takahashi. 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237: 104-116.
28. Nakashima, H., Y. Hamaguchi, R. Watanabe, N. Ishiura, Y. Kuwano, H. Okochi, Y. Takahashi, K. Tamaki, S. Sato, T.F. Tedder, and M. Fujimoto. 2010. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J. Immunol.*, 184: 4637-4645.
29. Y. Mochizuki, K. Yamashita, K. Fukuzawa, K. Takematsu, H. Watanabe, N. Taguchi, Y. Okiyama, M. Tsuboi, T. Nakano, and S. Tanaka, "Large-Scale FMO-MP3 Calculations on the

- Surface Proteins of Influenza Virus, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA)", *Chem. Phys. Lett.* 493 (2010) pp. 346-352.
30. 田中成典:「インフルエンザウイルスの分子シミュレーション」、*アンサンブル* 12, No. 4 (2010) pp. 27-30.
31. K. Fukuzawa, K. Omagari, K. Nakajima, E. Nobusawa, and S. Tanaka, "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", *Protein Peptide Lett.* 18 (2011) pp. 530-539.
32. A. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", *J. Mol. Graph. Model.* 30 (2011) pp. 110-119.
33. A. Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) pp. 1197-1202.
34. T. Nakano, Y. Mochizuki, K. Yamashita, C. Watanabe, K. Fukuzawa, K. Segawa, Y. Okiyama, T. Tsukamoto, and S. Tanaka, "Development of the Four-Body Corrected Fragment Molecular Orbital (FMO4) Method", *Chem. Phys. Lett.* 523 (2012) pp. 128-133.
35. S. Tanaka, C. Watanabe, and Y. Okiyama, "Statistical Correction to Effective Interactions in the Fragment Molecular Orbital Method", *Chem. Phys. Lett.* 556 (2013) pp. 272-277.
36. Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S: Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. *J Clin Virol.* 54(2): 130-134, 2012.
37. Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H,



- Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. *J Virol*. 86(23):13108-11, 2012.
38. Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Palmitoylation of CM2 is dispensable to influenza C virus replication. *Virus Res*. 157(1): 99-105, 2011.
39. Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S: Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J Virol*. 85(3):1322-1329, 2011.
40. Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M: A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virol J* 7(1):53, 2010.
41. Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S: Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J Virol* 84(4):1957-1966, 2010.
- 2.学会発表
1. 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
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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
6. Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
7. Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Yoshitaka Simotai, Seiji Hongo, Eri Nobusawa Antigenic structure or the hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) virus. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011
8. Yuichi Harada, Hiroshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura Growth Ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1 pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011.
9. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
10. 長谷川秀樹:次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
11. 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
12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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学術総会(横浜)2012 年 11 月
  16. 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総会(横浜)2012 年 11 月
  17. Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: 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総会(横浜)2012 年 11 月
  18. Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: 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総会(横浜)2012 年 11 月
  19. 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総会

- (横浜)2012年11月
20. 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総会(横浜)2012年11月
21. Takahashi, Y., T. Onodera, M. Tsuiji, and K. Kobayashi. 2012. Increased affinity maturation in lung memory B cells following influenza virus infection. 第41回日本免疫学会(神戸、12月)
22. Onodera, T., T. Kurosaki, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2012. B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza vaccination. 第41回日本免疫学会(神戸、12月)
23. Sato, K., Y. Takahashi, M. Ato, and H. Asanuma. 2012. Split-virion influenza vaccines induce high levels of virus-specific antibodies upon responses to a booster immunization. 第41回日本免疫学会(神戸、12月)
24. 伊藤洋子ほか, 不活化ワクチンに対する抗体反応無/低反応群の解析, 第66回日本細菌学会東北支部総会,2012年8月24日,仙台市
25. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎: 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第100回日本病理学会総会(横浜)2011年4月
26. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa  
INTRANASAL  
ADMINISTRATION OF  
2009/10 ANNUAL INFLUENZA  
VACCINE INDUCE THE  
CROSS-PROTECTION  
AGAINST 2009 PANDEMIC  
INFLUENZA VIRUS  
INFECTION, XV International  
Congress of Virology, Sep 2011  
Sapporo
27. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi