

るワクチン接種後の末梢神経麻痺 (Guillain-Barre 症候群)、2009 年に主にヨーロッパで使用された H1N1 パンデミックワクチン (新規アジュバント含有の一部の製品のみ) の接種後に生じた神経疾患 (ナルコレプシー「居眠り病」) などは、小規模の臨床試験では検出できなかった発生頻度の低い副作用が、多数の人に接種された際に発生したのである。このような事態を少しでも減らすためにも、プレパンデミックワクチンの拡大事前接種は重要な情報を提供することになる。さらに、使用期限が切れた備蓄ワクチンの廃棄・更新を繰り返すという無駄も解消できよう。

一方、新型インフルエンザの出現後には、この原因ウイルスに基づいた本格的な新型ワクチンの開発・製造が行われることとなる。現行の発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチン製造方法では、最初の供給までに最短でも 4 ヶ月を要し、当然第 1 波には間に合わない。さらに、国民全員分のワクチン供給には、発育鶏卵の供給次第では、最悪で 1 年半もかかる。そこで、これを半年に短縮するために、緊急大量製造が可能な細胞培養を用いた新規ワクチンの開発が、現在国家プロジェクトとして進められており、平成 25 年度の実用化を目指している。細胞培養ワクチンは、現行の鶏卵ワクチンと比較して多くの優位点があり、パンデミックワクチンとしてより望ましいものである。しかし、このような新しいワクチンが実用化されたとしても、新型インフルエンザ発生後に新型ワクチンの開発・製造を開始する限り、最初の供給は 3~4 ヶ月後になり、パンデミックの第 1 波への対応は難しい。従って、細胞培養ワクチンが導入された場合においても、H5 パンデミック出現のリスクが存在する限り、プレパンデミックワクチンの備蓄と事前・先行接種というプ

ライム・ブースト戦略は必要である。

今後の研究課題

今後の研究課題としては、以下の問題点の解明を進める必要がある。

1. ウイルス増殖特異性に関与しているアミノ酸変異について、ヒトへの適応の関係について解析を進める。
2. ポリメラーゼ形成と機能を評価するために構築したシステムをポリメラーゼ変異体や阻害剤を用いて検討する。
3. 季節性および動物由来のウイルスに対する抗インフルエンザ薬感受性試験系の改良および耐性株の判定基準のガイドラインの作成を行う。
4. H3N2v ワクチン製造の要否、診断系の配布を含めた事前準備、ガイドライン作成。
5. これまでに構築した遺伝子検出検査法に対して、引き続き最新の流行株を用いて検出感度や特異性について検証を行い、各検査系の精度管理を実施する。
6. パンデミックとなる可能性があるブタ型ウイルスあるいは鳥型ウイルス等に対して、型・亜型同定がより迅速かつ特異的に行えるよう検査系を改良する。
7. 鳥型ウイルスのヒト型受容体シアロ糖鎖認識変異検出・監視デバイスプロトタイプの改良と、実際に自然界で分離される高病原性鳥インフルエンザウイルスへの適用を応用。
8. 新規抗インフルエンザ剤の大量合成と、感染阻害機構の解明、動物レベルにおける感染阻害評価を検討する。
9. 薬剤耐性インフルエンザウイルスの監視と、その出現機構を解明する。
10. 2012 年に米国で多発したブタインフルエンザのヒト感染事例を教訓に、国内や動物検疫で摘発された事例からの分離ウイルスについて、遺伝子解析などのリスク解析を

行う。

1 1. H5N1 ウイルスが流行している海外のサンプルの調査。

1 2. パンデミックの予測、リスク評価にもとづいたプレパンデミックワクチンの活用（事前接種）による健康被害の最小化と社会機能の維持の戦略を確立。

E. 結論

新型インフルエンザ大流行による社会危機状況に対しては、最悪のシナリオを想定した、国による十分な事前準備と有効な緊急対応が必須となる。甚大な健康被害と社会的影響という最悪のシナリオで起こる H5N1 強毒型パンデミックの出現リスクは、予想外に高いことが強く示唆されている。この場合の健康被害は、現在で国が「想定」している最悪のシナリオ（スペインかぜインフルエンザ程度の致死率 2%；しかし最近、日本における健康被害はこの数倍はあり、当時の他の途上国と同様であったと指摘されている）を遥かに超えることが予想される。

「想定外」に対する準備・対応を怠ってきた 2011 年の東日本大震災からの重い教訓をもとに、平成 23 年 9 月 20 日に新型インフルエンザ対策閣僚会議で決定された新型インフルエンザ対策行動計画については、科学的基盤に立ったリスク評価に基づいた「最悪のシナリオ」の再検討が必要である。

一方、国による対策計画を実施可能にするためには、国の実施権限と地方自治体や民間・諸機関に対する協力要請・指示などに関する法的基盤が必要だが、我が国には、これらが欠落していることが (H1N1)2009 パンデミックからの重要な教訓の一つである。これに応じて、国家危機・社会危機などの緊急事態に対応した健康危機管理に関する新型インフルエンザ等特別措置法が制定されたが、

これは、感染症による社会危機に際して、緊急事態宣言がなされた後の国の緊急対応の基本を決めたものであり、それに必要な事前準備に対する対応が欠落した欠陥を持っている。これに対する具体的な問題提起と、国民の健康と安全を確保するための対策の見直しが必要である。

一方、現在の鳥型ウイルスがヒト型に変異する機序の解明に基づいた、動物とヒトでのサーベイランスの実施とリスク評価方法を確立する必要がある。その実績に基づいて、未曾有の危機状況に対する危機管理体制の再構築、即ち、具体的な事前準備と緊急対応計画の再検討とその実施が緊急課題である。

現時点では最も発生の可能性が高く、一旦発生すれば大きな健康被害と社会機能の崩壊にも至ると危惧されている強毒性 H5N1 パンデミックに対しては、プレパンデミックワクチンの事前接種による基礎免疫を賦与することで、その健康被害をある程度抑制されると期待される。

プレパンデミックワクチンの事前接種戦略無しには、この最悪のシナリオには対応が極めて困難である。パンデミックの予測、リスク評価にもとづいたプレパンデミックワクチンの活用（事前接種）による健康被害の最小化と社会機能の維持する戦略を確立して実施する必要がある、そのためには、より多数の人を対象とした臨床研究を実施して、安全性と有効性を検証することが必須である。

F. 研究発表

分担研究者の研究発表については、各分担報研究報告書に記載。

Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro

M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):897-908 (2012)

Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429: 51-56 (2012)

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.

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)

Sriwilajaroen 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.

Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kunihisa, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro, M. Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65:363-367, 2012.

Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A/H1N1pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods* 12/2012; DOI:10.1016/j.jviromet.2012.12.005 (2012)

WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen,

- H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. G.) Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *J. Influenza Other Resp. Virus.* 6: 1-5, 2012.
- 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)
- Ainai 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)
- Asanuma, H., Zamri, N. B., Sekine, S., Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Gilbert, R. S., Fukuiwa, T., Sata, T., Tashiro, M., Fujihashi, K. A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging. *Vaccine* 30: 803-812, 2012.
- Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y. Fu, S., Hirayama, N., Ohshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies *Jpn. J. Infect. Dis.:* 65, 19-27, 2012
- Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System (Cook, A. R., Barr, I., Hurt, E., Kelso, A., Reading, R., Ly, S., Seng, H., Buchy, p., Ung, S. A., Shu, Y., Xu, C., Xu, Z., Wang, D., Kama, M., Singh, P., Fujisaki, F., Odagiri, T., Tashiro, M., Archkhawongs, S., Khamphaphongphanh, B., Vongphrachanh, P., Kheong, C. C., Ismail, N., Burmaa, A., Darmaa B., Nymadawa, P., Grangeon, J.-P., Gourinat, A.-C., Huang, Q. S., Lopez, L. D., Juan M Lopez, J. M., Olveda, R. M., Roque, V., Jennings, L., Kang C., Lin, C., Lin, R., and Tee, W. S. N., Balish, A., Corwin, A., Kapella, B. K., Kitsutani, P., McFarland, J., Moen, A., Xu, X., Hoang, V.M.P., Long, N. L., Mai, L. Q., Hang, L. K. N., Nguyen, H. A., Nguyen, T. L., Nguyen, T. N., Asgari, N., Dawainavesi, A., Denehy, E. J., Dominguez, M. N., Jamsran, M., Kasai, T., Kool, J., Lewis, H., Luo, D., Olowokure, B., Partridge, J., Pavlin, B., Samaan, G., Singh, H., Tsuyuoka, R., Vakacegu A., Zhang, Z.) Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. *PLoS One.* 2012;7(5):e37568.
- 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* (in press, 2013)
- 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.* 7(3):552-62, 2012

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.* 61(Pt 6):820-9, 2012

Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID.* 66(2013) pp.65-68.

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: 109-117, 2012.

Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G, Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K.,

Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Pause on avian flu transmission research. *Science.* 335: 400-1, 2012.

Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G, Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Pause on avian flu transmission studies *Nature* 481: 443, 2012. doi:10.1038/481443a (2012)

Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., O. Kiselev, Klenk, H.-D., Kobinger, G, Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu. *Nature* 493: 460, 2013. doi:10.1038/nature11858 (2013)

Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S.,

Kaji, T., Yamamoto, K., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. Vaccine (2013 in press)

今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版) 国立感染症研究所 2012, http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf

今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. インフルエンザ診断マニュアル(第 2 版) 国立感染症研究所 2012, http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf

2. 学会発表

省略

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

行政施策への貢献の可能性

1. 本研究で、高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応するために重要なアミノ酸を特定することにより、新型インフルエンザ出現の可能性を予知または早期発見することができ、迅速な対応施策立案に貢献することができる。

2. これまでの遺伝子、抗原性変異のみの監視では検出不可能であった、ヒト型受容体変異を地球規模で直接監視する体制確立が可能となる。

3. ワクチンを補填し、これまでの抗インフルエンザ薬耐性株にも有効で、備蓄可能な次世代抗インフルエンザ薬の開発基盤が達成される。

4. 社会・経済機能を破綻させないためのインフルエンザ流行動向監視体制および事前準備の提言。

5. 万一、社会・経済機能が破綻した状況下での地域レベルでのインフルエンザ対策の提言。

6. 適切な投与方法を定めた抗インフルエンザ薬の使用指針の提言。

7. インフルエンザパンデミック対策における哺乳動物の公衆衛生学的重要性を発信し、対策を提言。

ウイルスの宿主域規定要因と人への順化機構、 ウイルス病原性の分子基盤の解明

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

2009 年から 2010 年にかけて、ベトナムにてヒトおよび鳥から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスについて、ニワトリ肺線維芽細胞（DF-1）、イヌ腎臓由来細胞（MDCK）、ヒト II 型肺胞上皮培養細胞（A549）における増殖性の比較を行った。その結果、DF-1 細胞では、増殖に大きな違いを認めなかったが、MDCK 細胞および A549 細胞では増殖性に差が認められた。特に A549 細胞で増殖しやすい株の中に、ウイルスの宿主域に関与することが知られている変異を持たない株が存在した。このことから、これらの株を比較することにより、ウイルスの宿主域に影響を及ぼす新たな変異を見つげられる可能性が考えられる。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは時にヒトに感染するが、ヒトからヒトへの伝播は感染者への濃厚接触のみでほとんど例がない。ヒト体内で増殖しやすく、ヒトからヒトへ伝播しやすくなった場合、H5N1 ウイルスがパンデミックを引き起こす可能性がある。どのような変異が起きるとヒトで増殖・伝播しやすくなるかについての知見を蓄積し、分離ウイルスのリスク評価のための判断材料とすること、さらに H5N1 ウイルスのヒトへの適応メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

2009 年から 2010 年にかけて、ベトナムにてヒトから分離された 8 株、および鳥か

ら分離された 2 株、計 10 株の H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて、ニワトリ肺線維芽細胞（DF-1）、イヌ腎臓由来細胞（MDCK）、ヒト II 型肺胞上皮培養細胞（A549）における増殖能を比較解析した。

さらに、ヒトの細胞で増えやすい株と増えにくい株の増殖性の違いに関与する変異を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、臨床患者から分離したウイルスを用いるため、東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を受け、実施している。承認番号：21-69-220427

C. 研究結果

① DF-1 細胞では、解析した 10 株とも効

率よく増殖し、その増殖性に差は認められなかった。

MDCK細胞では、最も増殖能の高い株と最も増殖能の低い株との間で 10^4 PFU/ml の差が認められた。

A549 細胞では、高い増殖能を示す株もあったが、一方で鳥分離株のうちの1株は全く増殖できず、株間に大きな差が認められた。

- ② PB2 の 627 番目のアミノ酸のグルタミン酸からリシンへの変異が哺乳動物細胞での高増殖性に関与することが知られている。そこで、本研究で用いた 10 株について調べたところ、ヒト分離株のうちの4株はグルタミン酸であったが、いずれも他の 627 番目にリシンを持つ株と同様に、A549 細胞でよく増殖した。今回解析した 10 株には、PB2 の 627 番目以外の、ヒトの細胞での増殖性に関与することが知られているアミノ酸変異を持つものはなかった。
- ③ PB2 の 627 番目にグルタミン酸を持ち、A549 細胞で良く増える株と増えにくい株を比較することで、ヒトの細胞における効率の良い増殖に関与する変異をみつけられる可能性が考えられた。

D. 考察

哺乳動物細胞での増殖に関与する既知のアミノ酸変異を持たず、ヒト由来細胞で高い増殖能を示す株が見つかった。本ウイルス株を解析することにより、ヒトの細胞における効率の良い増殖に関与する未同定の変異を見つけられる可能性がある。今後、増殖性の異なる株を用いて解析を進め、増殖に関わるアミノ酸変異と、ヒトへの適応の関係について解析する。

E. 結論

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの、ヒト細胞における効率の良い増殖に関与する新たなウイルス因子を解明できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in Cytokine Production in Human Macrophages and in Virulence in Mice Are Attributable to the Acidic Polymerase Protein of Highly Pathogenic Influenza A Virus Subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

Noda T, Sugita Y, Aoyama K, Hirase A, Kawakami E, Miyazawa A, Sagara H, Kawaoka Y. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat Commun* 3:639, 2012.

Victor ST, Watanabe S, Katsura H, Ozawa M, Kawaoka Y. A replication-incompetent PB2-knockout influenza A virus vaccine vector. *J Virol* 86:4123-4128, 2012.

Watanabe T, Imai M, Watanabe S, Shinya K, Hatta M, Li C, Neumann G, Ozawa M, Hanson A, Zhong G, Fukuyama S,

Kawakami E, Simmons HA, Schenkman D, Brunner K, Capuano SV 3rd, Weinfurter JT, Kilander A, Dudman SG, Suresh M, Hungnes O, Friedrich TC, Kawaoka Y. Characterization in vitro and in vivo of pandemic (H1N1) 2009 viruses isolated from patients. *J Virol* 86:9361-9368, 2012.

Inagaki A, Goto H, Kakugawa S, Ozawa M, Kawaoka Y. Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions. *J Virol* 86:10200-10202, 2012.

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine* 30:6027-6033, 2012.

2. 学会発表

山地玲奈、山田晋弥、河岡義裕「H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応に関与するアミノ酸変異の同定」
Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び、緊急対応に関する研究
—蛍光タンパク質再構成法を用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成機構の解析—

研究分担者:長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

研究協力者:相内 章(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター第六室 研究員)

鈴木忠樹(国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員)

研究要旨: インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼはウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。インフルエンザのポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。我々は、RNA ポリメラーゼ3量体形成の分子機構を生きた細胞内で解析するために、蛍光タンパク質再構成(BiFC)法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに存在する PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合を生きた細胞内で可視化するバイオプローブを作成し、三量体形成をリアルタイムでモニタリングするシステムを構築した。構築したシステムを用いて、三量体形成を詳細に解析した結果、これまで三量体形成に関与しないと言われていた PA の N 末領域(PAN)が細胞内において適切な三量体形成を制御している事が明らかになった。

A. 研究目的

ウイルス RNA ポリメラーゼはインフルエンザウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。

インフルエンザウイルスのポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。興味深い事に、細胞内でのポリメラーゼ複合体の形成は、ウイルス複製の

場である核へのポリメラーゼ複合体輸送と密接に関わっており、多くの宿主因子との相互作用が重要な役割を果たしている。そこで、我々は、この分子機構を効率よく探索するために、細胞内でポリメラーゼ複合体形成とポリメラーゼ複合体核内輸送を同時に評価できるシステムの構築を試みる。このシステムは特異性の高いポリメラーゼの機能阻害薬のスクリーニングや、ポリメラーゼ三量体形成に関わる新たな宿主因子の探索に有用であると考えられる。我々は、この分子機構を解析していくために蛍光タンパク質再構成法(Bimolecular fluorescence

complementation; BiFC)を用いて細胞内で RNA ポリメラーゼ複合体形成とポリメラーゼ複合体核内輸送を同時に定量的に評価できるシステムの構築を試みた。昨年度までに BiFC 法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに存在する PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合を生きた細胞内で可視化するバイオプローブを作成し、三量体形成をリアルタイムでモニタリングするシステムの構築に成功した。本年度は、このシステムを用いて PA 分子の N 末領域にポリメラーゼ形成に関わる新たな機能を明らかにした。

B. 研究方法

1) プラスミドの作製

BiFC プラスミドは鋳型 cDNA から PB1、PB2 の配列を PCR 法により増幅し、pCXSIN ベクターにサブクローニングし、続いてポリメラーゼ配列の 3' 領域に蛍光タンパク質 Venus の N 末側 1~173 アミノ酸をコードする配列もしくは C 末側 155~228 アミノ酸をコードする配列を挿入し作製した。ポリメラーゼと蛍光タンパク質 Venus の間には NSR TKLGSA AANSADGGGGSGGSGGSGGGSTQG TGGS からなるリンカー配列を挿入した。本研究で用いた BiFC プラスミドを図 1 に示す。PA の全長を発現するプラスミドは C 末に myc タグを付加し pCXSIN ベクターにクローニングし作製した。PA の N 末領域 (PAN) の発現プラスミドは、PA の 1-240 番目のアミノ酸配列の C 末に myc タグを融合させ pCXSIN ベクターにクローニングし作製した。また、PA の C 末領域 (PAC) の発現プラスミドは、PA の 240-716 番目のアミノ酸配列の N 末にスタートコドン(ATG)、C 末に myc タグを付加し、pCXSIN ベクターにクローニングし作製した。本研究で用いた PA

プラスミドを図 2 に示す。の PA、PB1、PB2 の鋳型 cDNA は高田礼人博士(北海道大学)からインフルエンザウイルス A/PuertoRico/8/34(H1N1)の cDNA を供与していただいた。作製したプラスミドは、全てシーケンスを確認した。

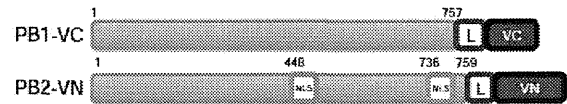


図1 本研究で用いた BiFC プラスミド

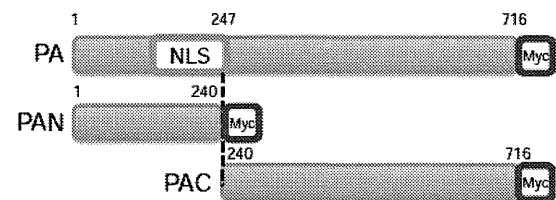


図2 本研究で用いた PA プラスミド

2) 細胞培養とトランスフェクション

培養細胞株としてヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞株に SV40 を形質転換させた 293T 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。トランスフェクションは、FuGENE HD(Roche Diagnostics)を用いてメーカー推奨プロトコルに従い実施した。

3) フローサイトメトリー

96well plate に播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細胞を cell dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で分散させ、1,500 rpm、3 min、4°Cで遠心し、2 ml の 2% fetal bovine serum (FBS) 含有 phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、1,500 rpm、3 分、4°Cで遠心し、400 μ l の 2% paraformaldehyde (PFA) / 2% FBS 含有 PBS に懸濁

した。処理した細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。

4) 蛍光顕微鏡解析

35 mm グラスボトムディッシュに播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細胞を 3% PFA で固定した。固定後、4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、共焦点顕微鏡 FV1000D (オリンパス) もしくは冷却 CCD カメラ (浜松フォトニクス) を備えた倒立蛍光顕微鏡で観察し、撮像した。得られた画像データは MetaMorph ソフトウェア (Molecular device) で解析した。

5) Raster image correlation spectroscopy

RICSデータ取得は、プラスミドをトランスフェクションした細胞を 37°C に維持したインキュベーターチャンバー (東海ヒット) を備えた共焦点顕微鏡 FV1000D で行った。油浸 60 倍 (1.35 NA) の対物レンズ、励起レーザーは 515nm のアルゴンレーザーを用いた。スキャンスピードは 10.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ 、スキャンエリアは 256x256 の 100 フレームでデータを取得した。電子ズームは 16.4 倍としピクセルサイズを 50 nm とした。RICSデータ解析は Fluoview1000 ソフトウェア (オリンパス) の RICS 解析パッケージを用いて行った。この条件での蛍光タンパク質 Venus の細胞質内での拡散係数は $25.1 \pm 7.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となり、他の手法で求められた値と矛盾しない。

C. 研究結果

1) 三量体形成における PA 責任領域の解析

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。この三量体は、PB1 をコアとして PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合という二つの直接結合によって形成されている。昨年度までの研究により、PB1-PB2 結合を可視化する BiFC プロブは三量体が形成された時に蛍光シグナルを出す事が明らかになった事から、この BiFC プロブを用いて、三量体形成における PA の N 末ドメインおよび C 末ドメインの機能を検討した。BiFC プロブと PA、PAN、PAC を共発現させると、PA と PAC では BiFC シグナルが検出され三量体形成されていると考えられた。一方、PAN では BiFC シグナルが検出されず、三量体形成が認められなかった (図 3)。以上の結果から、三量体形成には PA の C 末領域が必要不可欠であると考えられた。

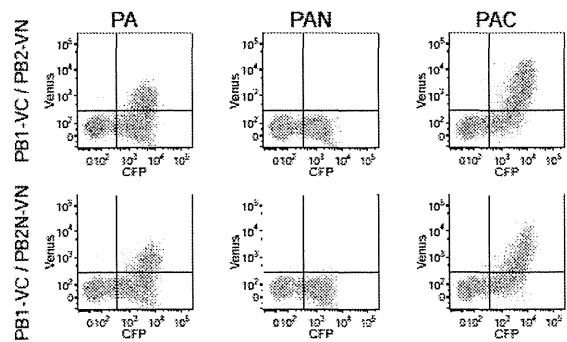


図3 PB1-PB2 結合を可視化する BiFC プロブを用いた PA の機能ドメインの解析。PA の C 末領域が三量体形成には不可欠である。

2) 三量体形成における PAN の機能

次に、PA および PAC による三量体形成に PAN がどのような影響を及ぼすかを検討するために、PB1-PB2 結合を評価する BiFC プロブに PA もしくは PAC を導入し、さらに夫々の細胞に PAN を発現させフローサイトメーターで解析した。その結果、

PA および PAC で誘導される三量体形成はいずれの場合においても PAN の共発現により著明に抑制される事が明らかになった(図4)。

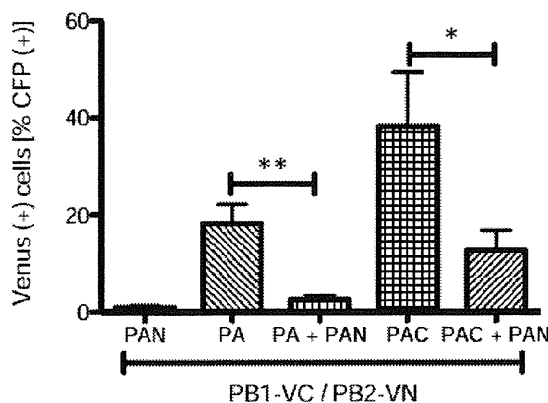


図4 PAN 存在下での三量体形成。PA および PAC により誘導される三量体形成は PAN により抑制される。

3) PAN 存在下で形成される三量体の細胞内局在の解析

これまでの結果により、PAN には三量体形成を制御する何らかの機能がある事が予想された。そこで、PAN 存在下で PA および PAC により誘導される三量体の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて解析した所、PA により誘導される三量体の細胞内局在は、PAN 存在下、非存在下、いずれの場合でも核内であり、変化は見られなかった。一方、PAC により誘導される三量体は PAN 非存在下では、細胞質に優位に存在した。さらに、PAN を共発現させると PAC により誘導された三量体は細胞質から核内に移行した(図5)。これらの結果から、PAC では三量体を形成することはできるが、適切な細胞内局在である核内への移行が阻害されており、PAN は三量体の核内移行に関与していると考えられた。

4) PAN による三量体の多量体化抑制

三量体を形成した RNA ポリメラーゼは、三量体同士が結合し多量体化することが知られている。このポリメラーゼの多量体化の意義については、不明な点が多いが、多量体化することによりウイルス RNA の転写や複製を促進している可能性が指摘されている。

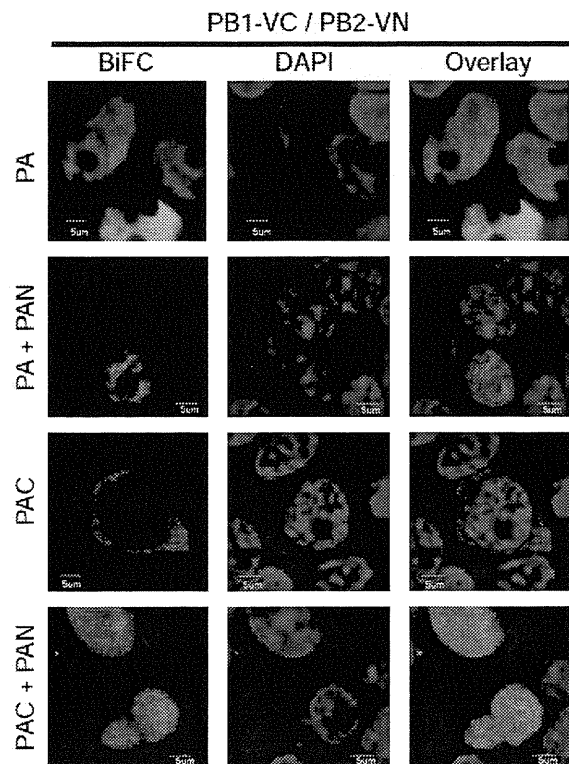


図5 PAN 存在下での三量体の細胞内局在。PAN は PAC により細胞質内に誘導される三量体の核内輸送を促進する。

そこで、PAN が三量体ポリメラーゼの多量体化に与える影響を検討するためにレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いた RICS (Raster Imaging Correlation Spectroscopy)解析を行った。RICS 解析は、空間相関アルゴリズムを用いることにより、LSM 画像から特定領域の拡散係数および分子数を算出することができる画像解析手法であり、細胞

の形態情報だけでなく、目標分子の機能解析や分子間相互作用の解析を行う事ができる。RICS 解析の結果、PAN の共発現により PAC により誘導される三量体は細胞内局在が変化するだけでなく、拡散係数も著明に増加していることが明らかになった(図6)。このことより、PAN は PAC により細胞質内に異所性に誘導されるポリメラーゼ多量体の形成を抑制することにより三量体の核内移行を促進していると考えられた。

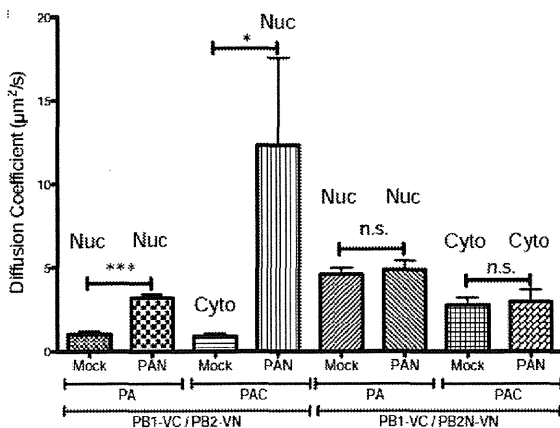


図6 PAN による三量体多量体化の抑制。PAC により誘導されるポリメラーゼの多量体化は PAN の共発現により著明に抑制された。

D. 考察

蛍光タンパク質再構成(BiFC)法によるインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの三量体形成を生き細胞内で可視化するシステムを用いて、PA の N 末領域のポリメラーゼ形成に関わる新たな機能を明らかにした。RICS 法による拡散解析により PAN は、細胞質内で異所性に三量体が形成されることを抑制し、本来の複製の場である核内でのみ三量体形成が起こるように制御している事が明らかになった。

本研究で得られた知見は、これまでの生化学的

解析方法では見出すことが困難な現象であり、本研究により構築したインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの BiFC プローブの有用性を示したものである。また、本研究で見出された PA の N 末領域の新たな機能は、今後のインフルエンザウイルス薬開発の新たな標的になる可能性が考えられる。

E. 結論

蛍光タンパク質再構成(BiFC)法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成をリアルタイムでモニタリングするシステムを構築した。構築したシステムを用いて、三量体形成を詳細に解析した所、これまで三量体形成に関与しないと言われていた PA の N 末領域(PAN)が細胞内において適切な三量体形成を制御している事が明らかになった。これらの発見は、特異性の高いポリメラーゼの機能阻害薬の開発に繋がる可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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, Ainai 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]
- 3) van Riet E, Ainai 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.
- 4) 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.
- 5) Ainai 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.
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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、千葉文: 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

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

ブタ由来のインフルエンザA(H3N2) variant ウイルスに対する日本国民の抗体保有
状況に関する研究

研究分担者 小田切孝人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター
第1室長

研究協力者 今井正樹、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、高下恵美、伊東玲子、
土井輝子、菅原裕美、金南希、佐藤彩、江島美穂（国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター第1室）

研究要旨

ブタ由来のインフルエンザ A(H3N2) variant(v) ウイルスへのヒト感染例が米国で急増している。ヒト社会で A(H3N2)v ウイルスが流行した場合に備えて、ワクチン製造株の確保とワクチン製造戦略の立案など事前準備が必要である。その一環として、本研究では日本国民の A(H3N2)v ウイルスに対する抗体保有調査を行った。10 歳以上の年齢層は A(H3N2)v ウイルスに交叉反応する抗体を比較的高いレベルで持っていたが、10 歳未満の小児では抗体陰性であった。このことから、A(H3N2)v ウイルスが流行した場合は、小児を中心とした流行になり、ワクチンの優先接種群もこの年齢層になることが明らかになった。

A. 研究目的

米国でブタ由来のインフルエンザ A(H3N2) variant(v) ウイルスにヒトが感染する事例が 2011～2012 年にかけて急増している。現時点ではヒトヒト感染は家族内や施設内での濃厚接触のケースに限定されているが、ヒト社会で広がった場合に備えて、ワクチン製造用に種ウイルスの確保、製造計画の立案および接種戦略の事前準備が必要である。国立感染症研究所（感染研）インフルエンザウイルス研究センターでは、既にワクチン製造用の種ウイルスは米国 CDC から入手しており、必要に応じて国内ワクチン製造所へ配布できる体制をとっている。一方、ワクチン接種戦略の立案には、どの年齢層が抗体を

もたず、ワクチンの優先接種群となるのかを事前に把握しておくことで、それをもとに必要なワクチン製造量の試算も可能となる。このため、本研究は、1 歳から 87 歳までの日本人について、各年齢層の A(H3N2)v ウイルスに対する抗体保有状況を把握する目的で調査研究を行った。

B. 研究方法

2011 年に採血して感染研の血清バンクに保管されている 1 歳から 87 歳までの各年齢層 30 名ずつの血清を用いて、2011 年米国でヒトから分離された A(H3N2)v ウイルス (A/Indiana/08/2011) に対する抗体保有状況を赤血球凝集抑制 (HI) 試験で調べた。対照

として、季節性インフルエンザ A(H3N2) ウイルス A/Brisbane/10/2007 に対する抗体保有状況も同時に調査した。

C. 研究結果

調査対象とした日本人の年齢区分は、1 歳から 19 歳までは 5 歳ごと、20 歳以上 87 歳までは 10 歳刻みの年齢群とした。各年齢層 30 名ずつについて、ウイルス感染リスクを 50% にし、ワクチンの有効性判断の指標とされる HI 抗体価 40 以上の保有率を、A(H3N2)v ウイルスおよび季節性インフルエンザ A(H3N2) ウイルスそれぞれについて調べた。

10 歳未満の小児では A(H3N2)v ウイルスに対する抗体は検出されなかったが、対照とした季節性 A(H3N2) ウイルスに対しては、10~85%と高いレベルで抗体を保有していた。一方、10 歳以上の年齢層では、A(H3N2)v ウイルスに対してはいずれの年齢層も抗体を持っており、最も高い保有率を示したのは、20-29 歳台 (95%)、次いで 30-39 歳台 (80%)、15-19 歳 (70%) であった。しかし、40-87 歳台では抗体保有レベルは中程度 (30-40%) であった。

D. 考察

日本人の A(H3N2)v ウイルスに対する抗体保有状況が明らかにされ、もし日本で A(H3N2)v ウイルスが流行した場合は、10 歳未満の年齢層での流行が中心となることが示された。よって、A(H3N2)v ワクチンの優先接種群もこの年齢層であり、必要なワクチン供給量の試算も可能である。さらに、流行の中心となる年齢層が限定されていることから、A(H3N2)v ウイルスによる大流行は起こらないと思われる。

これらの調査結果は、既に厚労省結核感染症課および関係諸機関と情報共有され、また WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク (GISRS) にも情報提供された。

E. 結論

・10 歳未満の小児は A(H3N2)v ウイルスに対する抗体をもたない。よって、A(H3N2)v ワクチンの優先接種群は、この年齢層となる。
・10 歳未満の小児が A(H3N2)v ウイルスの流行の中心となる可能性が高いので、A(H3N2)v ウイルスによる大流行は起こらないと予想される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):897-908 (2012)
- ・ Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429: 51-56 (2012)
- ・ 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)

・ 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)

・ Sriwilajaroen 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)

・ 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)

・ 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)

2. 学会発表

・ 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 May 2012

・ 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 大阪、2012年11月

・ 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 大阪、2012年11月

・ 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 大阪、2012年11月

・ 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 大阪、2012年11月

・ 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、馴化に伴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 横浜、2012年11月

・ 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

・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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し