

## 1-2) RNA ポリメラーゼを形成した PA-PB1 複合体の拡散解析

3量体を形成した RNA ポリメラーゼは、3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。そこで、BiFC プローブで可視化された PA-PB1 複合体が、3量体を形成し、さらにより大きな多量体を形成するかどうか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、PB2 の共発現により PA-PB1 複合体の拡散係数が約 1/2 となっていることが明らかになった。拡散係数が 1/2 となっているということは、分子の大きさが 8 倍になっている事を示しており、PA-PB1 複合体が PB2 の存在下で 3量体よりも大きな構造体を形成している事が考えられた。

## 1-3) RNA ポリメラーゼ内の PB1-PB2 結合の可視化

次に、3量体に存在するもう一つの直接結合である PB1-PB2 結合を可視化するための BiFC プローブを作製した。作製した BiFC プラスミドを適切な組み合わせ (PB1-VN と PB2-VC, PB1-VC と PB2-VN) で 293T 細胞にトランスフェクションした所、PB1-PB2 結合を示す BiFC シグナルはほとんど検出されなかった。しかしながら、蛍光タンパク質を融合していない PA を共発現すると PB1-PB2 の BiFC シグナルが核内に検出された。このことより、PB1-PB2 結合は、PA が存在する時の

みに形成される事が考えられた。また、この BiFC シグナルの RICS 解析により PB1-PB2 複合体は PA 存在下で 3量体よりも大きな構造体を形成していた。このことより、PB1-PB2 の BiFC プローブは PA-PB1-PB2 の 3量体の形成を検出している事が考えられた。

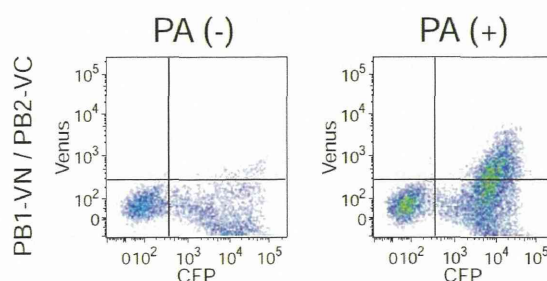


図 1 PB1-PB2 結合の可視化。PB1-PB2 複合体は PA 共発現下のみで形成された。

## 2) 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製

### 2-1) 喘息モデルを用いたウイルス感染

感染後喘息発作モデルにおいて、非感染群においては、有意な体重減少は観察されなかったが、感染群においては、喘息発作群および非喘息発作群のいずれにおいても体重減少がみられた。さらに、感染後に OVA を負荷した感染後喘息発作群の動物においては、感染後 3 日目の時点で、明らかな立毛と元気消失を認め、感染後非喘息発作群に比べ有意な体重減少の増悪が観察され、病態悪化が見られた。一方、喘息発作後感染モデルにおいては、感染群、非感染群のいずれの動物も感染後 3 日目の時点では明らかな立毛、元気消失は見られなかった。さらに喘息発作後感染群と非喘息発作後感染群を比較すると、喘息発作後感染群の体重減少率は有意に低下しており、病態の改善が見られた。

## 2-2) BALF 中炎症細胞の計測

感染後喘息発作モデルにおいて、感染後、経時的に採取したBALF中に認められた炎症細胞を種類毎に計測したところ、ウイルス感染後に喘息発作を誘発(感染後喘息発作群)すると、感染後非喘息発作群にくらべるとBALF中の好中球数は同程度であるが、好酸球数が有意に増加した。また、非感染喘息発作群に比べると、BALF中の好酸球数は有意に減少したが、好中球数が有意に増加した。

次に喘息発作後感染モデルにおいて、感染後、経時的に採取したBALF中に認められた炎症細胞を種類毎に計測したところ、喘息発作後感染群は、喘息発作後非感染群に比べると好酸球数は同程度であるのに対し、好中球数が有意に増加していた。一方、喘息発作後感染群は、非喘息発作感染群と比べると好中球数が同程度であるのに対し、好酸球数が増加していた。

## 2-3) BALF 中のケモカインの計測

感染後、経時的に採取したBALF中のケモカインを定量したところ、感染後喘息誘発モデルにおいては、MIP-1/CCL3、IP-10/CXCL10、KC、MCP-1/CCL2は感染後喘息発作群で最も高い傾向が見られた。なかでも、MCP-1/CCL2は、感染後に時間が経過するに従って増加しており、病態と最も関連していると考えられた。一方、喘息発作後感染モデルにおいては、いずれのケモカインも喘息発作群において有意に低かった。

## 2-4) BALF 中のウイルスタイトルの計測

次にBALF中のウイルス量をプラークアッセイにより定量した所、感染後喘息発作モデルにおいては、喘息発作群と非発作群で明らかな差は認められなかった。しかしながら、喘息発作後感染モデルにおいては、喘

息発作群において有意にウイルスタイトルの減少が見られた。

## D. 考察

### 1) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成モニタリングシステムの開発

蛍光タンパク質再構成(BiFC)法を用いて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、三量体中のそれぞれの結合を可視化することに成功した。BiFCプローブで可視化された複合体は、PA、PB1、PB2の3つのサブユニットが存在する時に、3量体よりも大きな多量体を形成する事がRICS法による拡散解析により明らかになった。また、PA-PB1結合は、PAおよびPB1の発現のみで形成されるが、PB1-PB2結合の形成には、PAの存在が必要不可欠である事が明らかとなった。X線結晶構造解析では、PB1-PB2結合の中にPAが存在しておらず、PAがPB1とPB2の相互作用の橋渡しをしていることは考えにくく、PAとPB1の結合がPB1に何らかのコンフォメーション変化を促し、PB2と結合ができる状態に変化していると考えられた。また、PB2非存在下で核と細胞質に局在していたPA-PB1複合体が、PB2の共発現により核内に集積したことから、まずPB1とPAが結合し、PA-PB1複合体が形成され、その後、PB1とPB2が結合し3量体を形成して核内に集積し、さらに多量体化すると考えられた。

本研究で構築したインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのBiFCプローブは生きた細胞内で多段階に起こる三量体形成を定量的に評価するアッセイ系であり、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に有用であると考えられる。

## 2) 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルであるNC/Ngaマウスを用いたOVA感作気管支喘息モデルではBALB/cマウスに比べ血中IgEの上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことが知られることから、気管支喘息の良い疾患モデルとされている。本研究ではこの気管支喘息モデルを用いてインフルエンザウイルス感染が喘息発作を悪化させるかどうか、検討を行った。この動物モデルにおいて経時的にウイルス学的、免疫学的に解析を進めたところ、ウイルス感染後、喘息発作を誘導した場合には、感染3日後のBALF中で好中球数、好酸球数が有意に上昇し、MIP-1/CCL3、IP-10/CXCL10、KC、MCP-1/CCL2、などのケモカインの産生量が高くなっており、体重減少率が増悪化し病態が悪化していると考えられた。しかしながら、BALF中のウイルス量には差が認められず、ウイルス性肺炎が悪化したとは考えにくく、喘息発作の増悪化が考えられた。一方、喘息発作を誘導後にインフルエ

### E. 結論

高病原性の新型インフルエンザ発生に対応するために、適切な治療薬開発の基礎となる治療薬スクリーニング用のインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼ形成モニタリングシステム開発と候補薬剤の評価を行うための新たな動物モデルを作製した。今後、これらの実験系を用いて、新たなインフルエンザ治療薬が開発されることが期待される。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

ンザウイルスを感染させると、感染3日後までのBALF中のウイルス量は喘息発作を誘導した場合に有意に減少していた。ケモカインの産生も、喘息発作を誘導した場合に減少し、感染後に喘息発作を誘導した場合は逆に減少しており、体重減少率も軽快し、ウイルス性肺炎が軽快したと考えられた。以上の結果から、インフルエンザウイルス感染後に喘息発作が起きた場合に症状の増悪が認められ、病態の悪化には種々のケモカインが関与していることが示唆された。また、病態増悪とBALF中のMCP-1産生量に正の相関が認められたことから、喘息発作によるインフルエンザ感染症の重症化の指標としてBALF中のMCP-1測定が有用である可能性が示唆された。本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動物モデルになることが考えられた。今後、この動物モデルを用いて、気管支喘息を背景に持つ重症インフルエンザ患者の適切な治療法が開発されることが期待される。

### 1. 論文発表

- 1) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 2) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013

- Sep;9(9):1962–70.
- 3) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki–Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai–Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):551–5. doi: 10.1038/nature12392.
  - 4) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194–200.
  - 5) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e68375.
  - 6) Dan K, Akiyoshi H, Munakata K, Hasegawa H, Watanabe K. A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM–CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. *Pharmacology*. 2013;91(5–6):314–21.
  - 7) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926–38.
  - 8) 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*. 2013 Mar;26(3):357–69.
  - 9) 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]
  - 10) 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.
  - 11) Yanagita H, Yamamoto N, Fujii 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.

- 12) 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.
- 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) Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Aina A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One*. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.
- 15) 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.
- 16) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol*. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.
- 17) 長谷川 秀樹, 田村 慎一 インフルエンザに立ち向かう インフルエンザワクチンの現状と展望 *Mebio*(0910-0474)30 巻 12 号 Page68-73 2013.12
- 18) 長谷川 秀樹 今、注目のワクチン 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン *ファルマシア*(0014-8601)49 巻 3 号 Page196-200 2013.03
- 19) 長谷川 秀樹 ワクチン対策の現状と課題 インフルエンザワクチン 化学療法の領域 (0913-2384)29 巻 2 号 Page230-234 2013.01
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(Intranasal Influenza Vaccine as a vaccine for next generation) 第86回日本細菌学会総会(幕張)2013年3月
- 2) 岡田 清吾, 長谷川 俊史, 長谷川 秀樹, 相内章, 池本 健三, 佐々木 功典, 戸田 昌一, 調 恒明, 市山 高志 インフルエンザ A/H1N1 2009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学術集会(広島) 2013年4月
- 3) 長谷川 秀樹 ワクチン研究の最前線 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチンの開発. 日本薬剤学会 第28年会(名古屋)2013年5月
- 4) 宮崎 将也, 王 磊, 長谷川 秀樹, 津田 真寿美, 西原 広史, 田中 伸哉 ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析. 第102回日本病理学会総会(札幌)2013年6月
- 5) 中島 典子, 佐藤 由子, 片野 晴隆, 長谷川 秀樹 感染病理学の新展開 新しい迅速 in situ ゲノム検出法の感染病理への応用. 第102回日本病理学会総会(札幌)2013年6月
- 6) 片野 晴隆, 佐藤 由子, 中島 典子, 福本 瞳, 鈴木 忠樹, 黒田 誠, 長谷川 秀樹 感染病理学

- の新展開 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 第 102 回日本病理学会総会(札幌) 2013 年 6 月
- 7) 長谷川 秀樹, 中島 典子 炎症・免疫機構の最新基軸と疾病の病理 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ 剖検例からの検討 第102回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
- 8) 長谷川 秀樹 良く効くインフルエンザワクチンを目指して. 第 54 回日本臨床ウイルス学会(倉敷) 2013 年 6 月
- 9) 長谷川 俊史, 岡田 清吾, 脇口 宏之, 市山 高志, 長谷川 秀樹, 相内 章, 調 恒明, 戸田 昌一, 熱田 了 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性インフルエンザの比較 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌) 2013 年 10 月
- 10) 脇口 宏之(山口大学 大学院医学系研究科小児科学分野), 岡田 清吾, 長谷川 秀樹, 相内 章, 戸田 昌一, 調 恒明, 長谷川 俊史 気管支喘息(病態)・免疫不全 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌)2013 年 10 月
- 11) 長谷川 秀樹, 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 浅沼 秀樹, 小田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津)2013 年 11 月
- 12) 鈴木 忠樹, 川口 晶, 相内 章, 田村 慎一, 小田切 孝人, 田代 真人, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津) 2013 年 11 月
- 13) 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 小田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津)2013 年 11 月
- 14) 渡辺 登喜子, 今井 博貴, 村上 晋, 中島 典子, 富田 有里子, 山西 誠也, 浦木 隆太, 西藤 岳彦, 内田 裕子, 長谷川 秀樹, 田代 真人, 河岡 義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月
- 15) 中島 典子, 佐藤 由子, 片野 晴隆, 佐多 徹太郎, 長谷川 秀樹 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 16) 泉地 恭輔, 相内 章, 鈴木 忠樹, 浅沼 秀樹, 梁明秀, 長谷川 秀樹 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 17) 池田 千将, 伊藤 良, 相内 章, 鈴木 忠樹, 田村 慎一, 荒尾 雄二郎, 田代 真人, 浅沼 秀樹, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 18) 相内 章, 浅沼 秀樹, 鈴木 忠樹, 原田 勇一, 田村 慎一, 田代 真人, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合

- わせが抗体応答に与える影響 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 19) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの炸裂 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H CHARACTERISTICS OF IGA VERSUS IGG HUMAN MONOCLONONAL 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 長谷川秀樹 成人T細胞性白血病(ATL)モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
- 32) 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 2011 年 4 月横浜
- 33) 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
- 34) Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 35) Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 36) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 37) Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 38) Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 39) Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba



- PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 40) Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATLITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 41) Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A HIGHY ATTENUATED SMALLPOX VACCINE LC16M8 AND PROTECTION FROM LETHAL MONKEYPOX XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 42) Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 43) 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京
- 44) 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京
- 国際学会
- 1) Hideki Hasegawa, Akira Aina, Tadaki Suzuki, Elly van Riet, Shi-ichi Tamura, Kazuyuki Ikeda, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Takeshi Kurata. ANTIBODY RESPONSES IN SERUM AND NASAL MUCUS INDUCED BY THE INTRANASAL VACCINATION WITH A WHOLE-VIRION INACTIVATED VACCINE OF A(H5N1)VIRUS IN HEALTHY NAÏVE HUMAN ADULTS. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 2) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira Aina, Tadaki Suzuki, Shin-ichi Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. ANTIBODY RESPONSES INDUCED BY INTRANASAL VACCINATION OF A WHOLE INACTIVATED INFLUENZA VIRUS IN MICE PREVIOUSLY INFECTED OR VACCINATED. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 3) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Aina,

Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. IMPACT OF THE QUATERNARY STRUCTURE OF HUMAN SECRETORY-IGA ON NEUTRALIZATION POTENCY TO INFLUENZA A VIRUS IN UPPER RESPIRATORY TRACT. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得(出願)

特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン 登録日平成 23 年 9 月 9 日

##### 2. 実用新案登録

なし

## 鳥およびブタ由来の新型インフルエンザの流行に備えた 事前準備に関する研究

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 第一室長

研究協力者 高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、伊東玲子、三浦舞、  
今井正樹、岸田典子、菅原裕美、佐藤彩、土井輝子

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 第一室

### 研究要旨

鳥インフルエンザ A(H5N1)、鳥インフルエンザ A(H7N9) およびブタ由来のインフルエンザ A(H3N2) variant は、ヒトへの感染例が断続的に報告されている。ヒト社会でこれらのウイルスが流行した場合に備えて、日本国内でも抗インフルエンザ薬やワクチンなどの事前準備が必要である。そこで、日本国内で使用されている抗インフルエンザ薬に対するウイルスの感受性試験系を構築し、抗インフルエンザ薬感受性のリスク評価を行った。またワクチン製造戦略の立案のために、日本国民の A(H3N2) variant ウイルスに対する抗体保有調査を行った。その結果、解析したウイルスは日本国内で使用されているすべての抗インフルエンザ薬に対して感受性を示し、治療効果が期待されることが明らかになった。また、10歳以上の年齢層は A(H3N2) variant 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歳未満の小児は抗体陰性であった。したがって、A(H3N2) variant ウイルスが流行した場合は、小児を中心とした流行が想定され、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

近年、インドネシア、ベトナム、タイやエジプトを中心に、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し、鳥インフルエンザ A(H5N1) を発症した事例が断続的に報告されている。また中国で2013年3月に世界で初めてヒトへの感染が確認された鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスは、現在も中国を中心にヒトへの感染が続いており、報告数は200例を超えている。米

国では、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。日本国内においてもこれらのウイルスが流行した場合に備えて、抗インフルエンザ薬やワクチンなどの事前準備が必要である。

日本国内においてインフルエンザの予防および治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 蛋白を標的と

するNA阻害剤、オセルタミビル（商品名タミフル）、ペラミビル（商品名ラピアクタ）、ザナミビル（商品名リレンザ）、ラニナミビル（商品名イナビル）が使用されている。新型インフルエンザパンデミック発生時の治療方針を定めるためには、ウイルスの抗インフルエンザ薬に対する感受性の確認が不可欠である。そこで本研究では、日本国内で使用されている4種類のNA阻害剤に対するA（H5N1）ウイルスおよびA（H7N9）ウイルスの感受性試験系を構築し、抗インフルエンザ薬感受性のリスク評価を行った。A（H3N2）variant（v）のヒト-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。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、本研究では、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

鳥インフルエンザ（H5N1）の流行に備えて感染研で保管しているA（H5N1）ウイルスの弱毒化ワクチン製造候補株を用いて、BSL2実験室において、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に対する感受性試験系の構築を試みた。次に、上記のワクチン製造候補株をβ-プロピオラクトン添加により不活化し、不活化A（H5N1）ウイルスについて同様の薬剤感受性試験を行って、感受性試験に対する不活化の影響を検討した。さらに、2011年10月にインドネ

シアのバリ島で発生した鳥インフルエンザ（H5N1）感染死亡例について、インドネシア国立衛生研究所（NIHRD）と共同でウイルス学的解析を進めるために、NIHRDから分与された分離株2株を、BSL3実験室においてβ-プロピオラクトン添加により不活化し、不活化確認試験終了後にBSL2実験室において薬剤感受性試験を行った。

中国でヒトから分離されたA（H7N9）ウイルスについて、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC<sub>50</sub>値を算出した。また、A（H7N9）ウイルスのNA遺伝子全長シーケンスを行い、既知の薬剤耐性変異の検索を行った。

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

A（H5N1）ウイルスの弱毒化ワクチン製造候補株を用いて、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に対する感受性試験系の構築に成功した。また、β-プロピオラクトンの添加により不活化したウイルスと添加前の活性型ウイルスについてそれぞれ薬剤感受性試験を行い、算出されたIC<sub>50</sub>値を比較したところ、有意な差はなかった。したがって、β-プロピオラクトンによるウイルスの不活化は、感受性試験結果に影響を及ぼさないことが明らかになった。この実験により、高病原性鳥インフルエンザウイルスをβ-プロピオラクト

ンで不活化することにより、BSL2実験室でも薬剤感受性試験を安全に実施できるようになった。次にインドネシアNIHRDから分与されたA(H5N1)分離株2株について、BSL3実験室においてβ-プロピオラクトン添加により不活化後、BSL2実験室においてオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を行った。その結果、2株ともすべての薬剤に対して感受性を保持していることが確認された。中国でヒトから分離されたA(H7N9)ウイルス、A/Anhui/1/2013およびA/Shanghai/1/2013についてオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施した。その結果、両ウイルスはすべての薬剤に対して感受性を示した。一方、両ウイルスのNA遺伝子について全長シーケンスを行った結果、A/Anhui/1/2013は既知の薬剤耐性変異をもっていなかったが、A/Shanghai/1/2013は既知の薬剤耐性変異R292Kをもつことが明らかになり、表現型と遺伝子型の結果が一致しないことが明らかになった。そこで、A/Shanghai/1/2013について、プラーククローニングによりウイルスの単離を行ったところ、A/Shanghai/1/2013は、R292K耐性変異ウイルスと野生型ウイルスの混合ウイルスであることが明らかになった。そこで改めて、単離されたR292K耐性変異ウイルスと野生型ウイルスについて、それぞれオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を行った。その結果、野生型ウイルスはすべての薬剤に対して感受性を示したが、R292K耐性変異ウイルスはすべての薬剤に対して感受性の低下を示すことが明らかになった。A(H3N2)v ウイルス (A/Indiana/08/2011) に対する抗体保有状況調査の対象とした日

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。その結果、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

A(H5N1) ウイルスおよびA(H7N9) ウイルスはBSL3実験室での取り扱いが規定されており、薬剤感受性試験など生物活性を測定する実験は、設備面や操作面での困難を伴う。そこで、β-プロピオラクトンの添加により、ウイルスを不活化して薬剤感受性試験を実施できることを証明した本研究により、BSL2実験室でもこれらのウイルスの薬剤感受性試験を安全に行うことが可能になった。日本国内で鳥インフルエンザA(H5N1) ウイルスあるいは鳥インフルエンザA(H7N9) パンデミックが発生した場合には、4種類のNA阻害剤(オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル)すべてについて、治療効果が期待される。しかし、すべての薬剤に対して感受性が低下するR292K変異ウイルスの出現に注意が必要である。また、耐性ウイルスの監視に際しては、表

現型解析と遺伝子型解析の両方を並行して実施することで、耐性ウイルスを見逃す危険性を回避できることが示された。

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。

#### E. 結論

BSL3 実験室において、高病原性鳥インフルエンザウイルスに  $\beta$ -プロピオラク톤を添加し、不活化することで、BSL2 実験室で安全に不活化ウイルスの薬剤感受性試験を行うことができた。A(H5N1) ウイルスおよび A(H7N9) ウイルスは、日本国内でインフルエンザの予防および治療に使用されている 4 種類の NA 阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）すべてに対して感受性を示し、治療効果が期待されることが明らかになった。一方で、NA 蛋白に R292K 変異をもち、すべての NA 阻害剤に対して感受性の低下を示す A(H7N9) ウイルスも検出され、耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握するためには、継続的に耐性ウイルスの監視を行う必要があることが示唆された。

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ため、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

- Ujike M, Ejima M, Anraku A, Shimabukuro K, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Fujisaki S, Yamashita K, Horikawa H, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Tashiro M, Odagiri T, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009–2010 *Emerging Infect Dis.* 17: 470-479 (2011)
- Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 83(7):1121-1127 (2011)
- Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. *Vaccine.* 29: 4156-4161 (2011)
- Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 83(7):1121-1127 (2011)
- Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. 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(46): 8330-8337 (2011)

Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis*. 64(3):237-41 (2011)

Onishi 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, and Yokot YT 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)

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)

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)

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)

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, and Odagiri T 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)

Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, and 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*. 188(1-2):73-5 (2013)

Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, and Odagiri T Mutations at the monomer–monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother* (March 26)(2013), doi:10.1007/s10156-013-0589-6

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N,

- Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. (2013) Jul 10. doi: 10.1038/nature12392
- Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan *Influenza Other Respi Viruses*. (2013) Jun 8. doi: 10.1111/irv.12132
- Ainai A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults *Hum Vaccin Immunother*. 9(9): Jun 27 (2013)
- Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System Vol 4 (3)*, (2013) doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009
- Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M and Odagiri T Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population *Jpn.J.Infect.Dis*.66: 549-551, 2013
- E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T.Odagiri, M Tashiro A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in japan, november to december 2013 *Eurosurveillance*, Volume 19, Issue 1, 09 January 2014
- 小田切孝人、田代真人 中国でヒトに感染した鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの性状、検査系の開発およびワクチン開発とその問題点 *ウイルス* 63(2), 233-240 (2013)

## 2. 学会発表

- E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, M.Tashiro and T.Odagiri Surveillance of antiviral drug-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 viruses in Japan *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions*, Hong Kong, May 2011.
- T. Odagiri Influenza activity in the northern hemisphere. Fifth Meeting of National Influenza Centres in the Western Pacific and South-East Asia Regions. Vientiane, Lao PDR, June 2011.
- E.Takashita, M.Ejima, I.Takayama, M.Nakauchi, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, T.Kageyama, M.Tashiro and T.Odagiri Detection of



antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in Japan XV International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.

H.Xu, N.Kishida, E.Takashita, S.Fujisaki, R.Ito, T.Doi, H.Sugawara, M.Ejima, N.Kim, M.Tashiro, T.Odagiri, and the influenza virus surveillance group of Japan Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in Japan XV International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.

N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Ito, T.Doi, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Ejima, N.Kim, R.Saito, H.Ikematsu, M.Tashiro and T.Odagiri Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells XV International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.

C.Kawakami, E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kim, S.Usuku, E.Kurata, M.Iwata, T.Toyozawa, T.Odagiri and M.Tashiro Neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan XV International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.

I.Takayama, E.Takashita, M.Ejima, M.Nakauchi, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, T.Kageyama, T.Odagiri and M.Tashiro Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, Rio de Janeiro, Brazil, November 2011.

小田切孝人, 岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、金南希、田代真人 国内外で分離された 2010/11 シーズンのインフルエンザ流行株について 第 25 回インフル

エンザ研究者交流の会シンポジウム 富山、2011 年 6 月

江島美穂、高下恵美、藤崎誠一郎、金南季、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、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 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスおよび耐性株検出状況について 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 富山、2011 年 6 月

川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、岩田真美、豊澤隆弘、高下恵美、江島美穂、小田切孝人、田代真人 2010/2011 シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性ウイルス 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 富山、2011年6月

岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、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、田代真人、小田切孝人「インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性をもとに評価した 2010/11 シーズン A/H3 および B 型ワクチンの効果」第 15 回日本ワクチン学会 東京、2011 年 12 月

高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、今井正樹、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、佐藤彩、田代真人、小田切孝人 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの検出と性状解析 First Negative Strand Virus-Japan Symposium 長崎、2012 年 1 月

小田切孝人 インフルエンザワクチン株選定プロセスとワクチンの問題点 First Negative Strand Virus-Japan Symposium 長崎、2012 年 1 月

小田切孝人 ヒトのサイドから見た高病原性鳥インフルエンザの流行とワクチン開発 第 153 回日本獣医学会学術集会 大宮、2012 年 3 月

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

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

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

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

Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, Hong Xu, Masaki Imai, Masato Tashiro, Takato Odagiri A cell-based screening system to evaluate the susceptibility of influenza viruses to T-705 (favipiravir) 15th International Negative Strand Virus Meeting Granada, June 2013

小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、金南希、江島美穂、高下恵美、今井正樹、田代真人、菅蒲川由郷、齋藤玲子 卵馴化によるインフルエンザワクチン株の抗原変異と2012/13シーズンのワクチン効果の評

価 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷、  
2013年6月

小田切孝人 季節性インフルエンザワクチ  
ンの現状と問題点 第27回インフルエン  
ザ研究者交流の会シンポジウム 札幌、  
2013年6月

Takato Odagiri The 10<sup>th</sup> Japan-Taiwan  
Symposium on Vaccine Preventable Diseases  
and Vector Borne Diseases and Cooperative  
Project Reports Tokyo, September, 2013

小田切孝人 インフルエンザー最近の動向  
とワクチンの評価、将来展望 第27回日本  
臨床内科医学会 神戸、2013年10月

小田切孝人 動物由来インフルエンザウイ  
ルス (A/H3N2 variant、A/H7N9) のヒト感  
染例とワクチン開発 第13回人と動物の共  
通感染症研究会学術集会 東京、2013年11  
月

岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋  
弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小  
田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に  
中国で分離されたA(H7N9)鳥インフルエン  
ザウイルスの家禽に対する病原性の解析  
第61回日本ウイルス学会 神戸、2013  
年11月

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

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

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 新型インフルエンザ対応および薬剤耐性株の出現に係る インフルエンザウイルス検出系の構築ならびに国内検査体制の整備

研究分担者 影山 努：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室長  
研究協力者 高山郁代：同上 研究員  
高橋 仁：同上 主任研究官  
中内美名：同上 主任研究官

研究要旨： 新型インフルエンザ対応に係るインフルエンザウイルスの同定検出法として、ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出法、鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法、A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルス中のオセルタミビル耐性株の構成割合を簡便に求める方法の構築を行った。また、中国での鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのヒトへの初感染例の報告を受け、real-time RT-PCR 法を用いたユーラシア系統 H7 亜型ウイルスに対する高感度かつ特異的な HA 遺伝子検出系を迅速に構築し、全国地方衛生研究所ならびに検疫所へ検査用試薬や陽性コントロールとともに配布にされ、直ちに日本全国で H7N9 ウイルスに対する核酸検出検査が可能な体制を整えた。

### A. 研究目的

#### 薬剤耐性株の検出系について

日本は、世界最大の抗インフルエンザ薬の使用国であり、薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握することは極めて重要である。

2010/2011 シーズン以降、日本での A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルスの薬剤耐性株サーベイランスでは、当センターが構築した NA タンパク質の 275 番目のアミノ酸変異（H275Y:オセルタミビル耐性変異）を検出する real-time RT-PCR 法が用いられている。

患者体内で薬剤耐性株が出現する過程では、275H を持つ薬剤感受性株と 275Y を持つ薬剤耐性株が混在した状態になることが知られている。そこで、薬剤耐性株の性状

解析を行うことを目的とし、以前に構築した 275H、275Y を判定できる方法を改良し、ウイルス中の 275H と 275Y の構成割合を高感度に検出する方法の構築について検討した。

#### ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出法の構築

2011 年以降、北米大陸においてブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスのヒトへの感染が散発的に起きている。このウイルスが日本で流行する場合に備えて、現在流行している A/H3 亜型インフルエンザウイルス（香港型）と識別できる特異的な real-time RT-PCR 法による検査系の構築を行う事を目的とし、本研究を遂行した。