

インフルエンザウイルスサーベイランスにおける地方衛生研究所および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

研究分担者 渡邊 真治

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

研究要旨

日本におけるインフルエンザウイルスサーベイランスは地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）と連携により成り立っている。したがって、この協力・連携体制を維持し、さらに強化することが、今後も有効なサーベイランスを実施する上で重要である。平成 27 年度は、国内におけるサーベイランスの重要性の再認識と強化を目的に、地方衛生研究所のサーベイランス担当者と協議し、サーベイランスに関する情報交換・技術支援を行い、時宜にかなった検体およびウイルス分離株の収集を図った。平成 28・29 年度は、地衛研へのウイルス分離・同定に関する技術面での支援を目的に、ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を進めた。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルスの出現や季節性インフルエンザウイルス変異株の出現を監視するために、ウイルスサーベイランスは必須である。さらに、それらウイルスに対するワクチン作製のためのウイルス株確保のためにもウイルスサーベイランスは重要である。そのため地衛研と感染研の協力・連携体制を維持し、国内におけるインフルエンザウイルスサーベイランスの重要性の再認識とさらなる強化を目的とした。

B. 研究方法

現在、国内の地方衛生研究所は都道府県単位で 6 つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、近畿地区、中国・四国地区、九州地区）に分けられており、ブロック単位で研究所間の連携を図るため、各種会議が開催されている。6 つのブロックのうち、4 つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区）で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と

協議した。

また、サーベイランスの一環であるウイルス分離・培養技術支援のために、ウイルス分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立を目標に、各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

地衛研と感染研が協力して行っているサーベイランスの成績が WHO を中心とした世界インフルエンザ監視システムに提供され、季節性ワクチン株選定の大切な資料となっていることを説明し、サーベイランスの重要性について再認識していただいた。非流行期におけるサーベイランスの意義については考え方が統一的ではない印象があったため、変異株の出現を捉えるという意味では、非流行期・流行期間問わず年間を通して、かつタイムリーな監視が重要であり、その視点での連携体制をお願いした。

この協議の中で、ウイルス分離やウイルス性状を利用した亜型・系統同定などの技術に関する質問や意見が出た。実際、季節性 H3N2 亜型ウイルスの分離・同定は国際的にも問題となっている。そこで技術支援を目的に、呼吸器系由来株化細胞およびインフルエンザウイルス分離に使用実績のある結腸由来株化細胞を用意し、インフルエンザウイルスの増殖効率を検討した。通常、株化細胞は継代後 3-4 日で培養面一面に増殖し、その状態でウイルス感染に用いられることが一般的である。ところが、肺胞上皮由来株化細胞において、長期間（約 3 週間）培養によって細胞の性質が分化状態へ誘導される報告があり（Cooper et al., PLoS One, 11: e0164438, 2016）、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について、通常培養と長期間（2 週間）培養を行い、ウイルスの増殖について調べた。インフルエンザウイルスの増殖には、トリプシン様酵素が必須であるが、通常培養（2-3 日間）ではトリプシン非存在下ではウイルス増殖が確認されなかったが、長期間培養ではトリプシン非存在下においてもウイルス増殖が確認された。このことは、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化したことを示唆している。

D. 考察

サーベイランス担当者と実際に意見交換を持つことは、生の現場の声を聴き、かつこちらの思いも伝えることが出来るため、感染研-地方衛生研究所の連携体制にとって大変意義のあるものと実感した。今後も積極的に意見交換・情報共有を行うことが、地衛研-感染研の協力連携体制を維持し、サーベイランスを実施する上で大変重要である。

現時点ではインフルエンザウイルスの分離増殖効率改善が見込める細胞株を選定できていないが、Detroit 562 細胞は、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化し

たことを示唆しており、よりヒト体内における性質を有した細胞に状態が変化し、そのためウイルスが増殖出来るようになったと考えられた。今後は、この細胞で増殖させた時に誘導される変異の蓄積の情報を収集し、その結果、誘導される変異が少なければ、実際のサーベイランスにも活用できる可能性がある。また、この細胞に季節性ウイルスが効率よく感染できるように、レセプターの発現を調節した細胞株を樹立して、サーベイランスに活用できる可能性を模索する。

E. 結論

地衛研のインフルエンザ担当者と意見交換・情報共有を行い、地衛研-感染研の協力・連携によるサーベイランスの重要性を再認識した。

ウイルス分離・増殖に関する技術支援の一環で、分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y, An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation., PloS Pathog., 11(6)
- Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y., Molecular determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus., J. Virology., 89(22), 11337-11346, 2015
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza

- Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015. , *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
- Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y., Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein., *Sci. Rep.* , 6, 19933, 2016
 - Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y., The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes., *Nat. Microbiol.* , 1(8), 16062, 2016
 - Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y., Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses., *Nat. Microbiol.* , 1(6), 16058, 2016
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016., *Euro surveill.*, 21(24), , 2016
 - Sarawar S, Hatta Y, Watanabe S, Dias P, Neumann G, Kawaoka Y, Bilsel P., M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice., *Vaccine*, 34(42), 5090-8, 2016
 - 渡邊真治, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 香港型インフルエンザウイルスの最近の変異(性状変化) , *インフルエンザ* , Vol. 17 No. 3, 37-44 2016
 - Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H., Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a., *Front Microbiol.* , 8, 584, 2017
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S., Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015., *Influenza Other Respir Viruses.* , 11(5), 399-403, 2017
 - Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y., A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus

Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets., Cell Host Microbe., 22(5), 615-26, 2017

- Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I., Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season., J Infect Chemother. , pii: S1341-321X(18)30007-2., 2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T., Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin., Jpn J Infect Dis. , (In press)

2. 学会発表

- 渡邊真治. 2014/15シーズンのインフルエンザ流行株と平成27年度ワクチン株について. 5th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄、2016
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015
- Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. A novel host factor plays a key role in the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complexes.

s. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015

- Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Tiago L, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of an H5N1 influenza A virus expressing a reporter gene. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015
- 渡邊真治. 日本でのヒトに対する動物インフルエンザ対応. 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京、2015
- 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人. 2015/16シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第48回日本小児感染症学会、岡山、2016
- 宇田 和宏、古市 宗弘、小山 ちとせ、岩瀬 徳康、藤崎 誠一郎、渡邊 真治、庄司 健介、宮入 烈. 2015-16年シーズンのインフルエンザ下気道炎の臨床的特徴. 第48回日本小児感染症学会、岡山、2016
- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses selected for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- Takashita E, Fujisaki Y, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T. Detection of influenza A(H1N1)pdm

- 09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Analysis of the regulatory mechanisms of the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
 - Kishida N, Imai M, Aina A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Saikusa M, Usuku S, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
 - Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Involvement of CLUH in the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Upadhyay BP, Shaky G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
 - Kishida N, Imai M, Aina A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus seasonal influenza vaccine in ferret. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watababe S, Odagiri T. Gene analysis of influenza A (H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 seasons. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses selected for the 2017/18 season. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017
 - Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H,

Akimoto M, Sugawara H, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/ 103/2014 (H3N2) strain. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし