

I. 総括研究報告書

新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資する サーベイランス及びゲノム解析に関する研究

研究代表者 長谷川 秀樹

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・センター長

研究要旨

本研究班は、国内およびアジア地域での新型及び季節性インフルエンザウイルス株サーベイランス体制を維持強化し、インフルエンザウイルスの抗原性解析法の改良、ウイルス分離効率の向上、抗ウイルス薬に対する耐性株出現状況の把握、動物種を超えてウイルスが安定定着する遺伝的要因の解析など幅広い研究を行い WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）や国内でのインフルエンザ対策やワクチン株選定に有用なデータを示し貢献した。また、新型インフルエンザウイルスの海外発生の継続的な監視および病原体の迅速な入手と解析を継続し、ワクチン製造候補株の更新に貢献した。この研究により、わが国の新型インフルエンザ対策を遅滞なく進めることができた。さらに、インフルエンザワクチンの血清学的な評価研究をおこない、ワクチンの有効性の評価やワクチン株の適正な選定に貢献した。

A. 研究目的

- (1) 季節性および新型インフルエンザウイルス株サーベイランス体制の維持・強化。国内においては地衛研、海外においては周辺諸国及び GISRS と連携し、流行ウイルス株の収集力と解析方法の改良とそれらの国際標準化を促進する。
- (2) 地衛研から分与された臨床検体を用いてウイルスの分離効率の改善が期待できる細胞株の検討や分離株を用いて抗原解析法の改良を試みる。
- (3) WHO インフルエンザ協力センターとしての国際貢献およびわが国のワクチン株選定への基礎データを得る研究を行い、国内および世界のインフルエンザ対策に直接的に参画し、研究から得られた成果、情報を適宜提供し、国内外のインフルエンザ対策に貢献する。

B. 研究方法

- A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株として、上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について AH1pdm09 ウイルス、B ビクトリア系統ウイルス、B 山形系統ウイルスの増殖性の評価を行った。
- A (H3N2) 流行株の抗原性解析系として確立した中和試験法 Focus Reduction Assay (FRA) の更

なる改良と標準化を行った。

- 2019/20, 2020/21 シーズンに国内および海外から収集した分離ウイルス株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。
- 地衛研における薬剤耐性株検出検査の精度評価試験を実施した。
- 新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、2020-2021 年シーズン HA インフルエンザワクチン(4 価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種 3-4 週間後の 2 回、血清を採血した。

(倫理面への配慮)

ワクチン接種前後の成人層および老人層の血清抗体の採取においては、患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

C. 研究結果

- ① サーベイランスに用いてきた MDCK 細胞の代替えとなる細胞を検索し、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について検討し、サーベイランスに導入可能か検討した。A/H3N2 亜型ウイルスだけでなく、A/H1N1pdm09 亜型ウイルス、

B型山形系統ウイルスおよびB型ビクトリア系統ウイルスも、同程度増殖し使用できる事になった。

- ② 近年の H3N2 亜型ウイルスのノイラミニダーゼ (NA) は 151 番目アミノ酸アスパラギン酸がグリシンや他のアミノ酸に置換 (NA D151X) することで NA のシアル酸結合能及び感染能を獲得することを確認した。これは、中和試験法でのヘマグルチニン (HA) の正確な抗原性評価を妨げることから、MN/FRA の中和反応時に NA 阻害薬であるオセルタミビルを添加する新手法を取り入れた。
- ③ 2019/20, 2020/21 シーズンのインフルエンザウイルス分離株について遺伝子解析を実施した結果、A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2) ウイルス、B型 Victoria 系統ウイルスの遺伝子が多様化し抗原性が異なる集団も存在するため、来シーズンへ向けての流行ウイルスの監視が必要である。
- ④ 2019-2020 年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果は A/H1N1pdm09 を除き、成人層、高齢者層共に良好であった。今年度から A/H1N1pdm09 と A/H3N2 のワクチン株が変更となったが、A/H1N1pdm09 は抗体価上昇が低く終わった結果であった。来年度も同じ株が選択されれば抗体価は徐々に上昇していくと考えられる。一方で、A/H3N2 は新しい株に変更になったにもかかわらず、高い抗体価の上昇が認められ、免疫原性が高いことが示唆された。調査を行った情報は、次のシーズンのワクチン株の選定のために有益であるため、今後も調査の継続が必要である。
- ⑤ 動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価試験の一環として、インドネシア及びネパール国において分離された株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。

D. 考察

国内および WHO のインフルエンザ株サーベイランスおよびワクチン候補株の検索と選定を支援するための抗原解析法の技術改良や HA, NA 蛋白の変異検索など基礎的研究を進め、これらの基盤強化への貢献をした。

また、本研究班では薬剤耐性株検出検査精度の調査の調査を行い、本研究の目標達成に前進が見られた。さらに、各年度の国産ワクチンの有効性評価の一環として、免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した。

E. 結論

- ウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を継続した。
- 前年度に確立した A/H3N2 亜型分離株抗原性解析法に感染細胞集減数試験法 (Focus reduction

assay, FRA) をさらに改良し正確な抗原性解析ができる系を構築し検証した。

- ワクチン接種者のヒト血清を用いることで、フェレット感染血清では捉えることができなかった A(H1N1)pdm09 の抗原性の変化を捉えた。
- A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2) ウイルス、B型 Victoria 系統ウイルスの遺伝子が多様化し抗原性が異なる集団も存在するため、来シーズンへ向けての流行ウイルスの監視が必要である。
- 地衛研での薬剤耐性株検出検査精度が良好であることが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ariyoshi T, Tezuka J, Yasudo H, Sakata Y, Nakamura T, Matsushige T, Hasegawa H, Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsuta R, Ohga S, Hasegawa S. Enhanced airway hyperresponsiveness in asthmatic children and mice with A(H1N1)pdm09 infection. *Immun Inflamm Dis.* 2021 1
- Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, Ainai A, van Riet E, Tabata K, Saito K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, Maruno T, Usami K, Uchiyama S, Ogawa-Goto K, Hasegawa H. An influenza HA stalk reactive polymeric IgA antibody exhibits anti-viral function regulated by binary interaction between HA and the antibody. *PLoS One.* 2021 1, 16(1), e0245244.
- Yamazaki T, Biswas M, Kosugi K, Nagashima M, Inui M, Tomono S, Takagi H, Ichimonji I, Nagaoka F, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J, Akashi-Takamura S. A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza. *Front Immunol.* 2020 12, 11, 606518
- Abe M, Katano H, Nagi M, Higashi Y, Sato Y, Kikuchi K, Hasegawa H, Miyazaki Y. Potency of gastrointestinal colonization and virulence of *Candida auris* in a murine endogenous candidiasis. *PLoS One.* 2020 12, 15(12), e0243223.
- Nakano T, Ohara Y, Fujita H, Ainai A, Yamamura ET, Suzuki T, Hasegawa H, Sone T, Asano K. Double-Stranded Structure of the Polyinosinic-Polycytidylic Acid Molecule to Elicit TLR3 Signaling and Adjuvant Activity in Murine Intranasal A(H1N1)pdm09 Influenza Vaccination. *DNA Cell Biol.* 2020 9, 39(9), 1730-1740
- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife.* 2020 9, 9, e60067
- Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Nakajima N, Gregg RW, Katsura H, Tomita Y, Maemura T, da Silva Lopes TJ, Watanabe T, Shoemaker JE, Hasegawa H,

Yamayoshi S, Kawaoka Y. Pathogenesis of Influenza A(H7N9) Virus in Aged Nonhuman Primates. J Infect Dis. 2020 9, 222(7), 1155-1164

- Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. Jpn J Infect Dis. 2020 9, 73(5), 386-390
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. Antiviral Res. 2020 8, 180, 104828
- Emi-Sugie M, Shoda T, Futamura K, Takeda T, Aina A, Hasegawa H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Robust production of IL-33 and TSLP by lung endothelial cells in response to low-dose dsRNA stimulation. J Allergy Clin Immunol. 2020 4, S0091-6749(20), 30570-4
- Aina A, van Riet E, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Suzuki T, Tamura SI, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Multihartina P, Setiawaty V, Pangesti KNA, Hasegawa H. Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine. Microbiol Immunol. 2020 4, 64(4), 313-325

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況