

## 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・呼吸器系ウイルス研究センター・センター長

### 研究要旨

本研究班は、国内および東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、流行株の抗原性解析法の改良、ウイルス分離効率の向上、鶏卵馴化変異回避遺伝子の特定、新規薬剤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成果を行い 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効活用された。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。これにより、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および GISRS と連携し、流行株の収集と解析方法の改良と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貢献をすべく研究を行い、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。

善する細胞株として、上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討してきた。

- 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) の改良と標準化を行った。
- 2018/19, 2019/20, 2020/2021 シーズンに国内および海外から収集した分離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。

### B. 研究方法

- A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改

(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、同程度増殖することが明らかとなった。
- ② 最近の H3N2 亜型ウイルスのノイラミニダーゼ (NA) の 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 によるレセプター結合能、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ていることから、MN/FRA の中和反応時にオセルタミビルを添加する新手法を確立した。
- ③ 2018/19, 2019/20, 202/2021 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 鶏卵分離埼玉株のノイラミニダーゼ(NA)蛋白を詳細に解析し、本株の NA がシアル酸レセプター結合能をもち、赤血球凝集素蛋白(HA)によらない感染様式で感染を成立させることを解明した。また、埼玉株以外の HA でも、同様の現象が見られるかどうかを明らかにするため、埼玉株以外の A(H3N2)ウイルスの HA と鶏卵分離埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代

して HA に変異が入るかどうかを検証した。その結果、鶏卵で 5 代継代後も HA に変異は入っていなかった。したがって、埼玉株 NA を持っている、埼玉株以外の HA でも、鶏卵馴化による抗原変異が起りづらいことが示唆された。

- ⑤ 日本国内においてヒトからヒトへの感染伝播を起こしたと思われるオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスおよびパロキサビル耐性変異 A(H3N2) ウイルスを検出した。抗インフルエンザ薬耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。
- ⑥ 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。これらの国においては、未だヒト感染例が絶えず報告されていることから、今後も継続的なグローバルサーベイランスの実施が必要であると考えられる。
- ⑦ ネパールで 1 例目となる A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が検出された背景としては、2018 年 12 月から 2019 年 2 月にかけてインド北部の鳥の間で A(H5N1)ウイルスのアウトブレイクが発生していたことや 2019 年 2 月中旬以降にネパールの家禽や野鳥の間でこのウイルスが急速に流行していたことが挙げられる。今回、ヒト感染例から検出されたウイルスは、ネパール周辺国の鳥の間で流行し続けているクレード 2.3.2.1a のウイルスで、引き続き、この地域の国々では、A(H5N1)ウイルスへの感染リスクが大きいと考えられた。

### 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。海外ワクチンの情報（非公開）と比べて、国産ワクチンは免疫原性が低いことが示唆され、今後の国産ワクチンの改良を検討する。

## 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。
- A/H3N2 亜型分離株抗原性解析法に感染細胞巣減数試験法 (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。
- 2019-2020, 2020-2021 年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果を調査した。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。

## F. 研究発表

### 1. 研究発表

- ・ 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
- Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Murakami J, Yasuhara A, Takada K, Ito M, Nakajima N, Takahashi K, Lopes TJS, Dutta J, Khan Z, Kriti D, van Bakel H, Tokita A, Hagiwara H, Izumida N, Kuroki H, Nishino T, Wada N, Koga M, Adachi E, Jubishi D, Hasegawa H, Kawaoka Y. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. *Nat Microbiol.* 2020 Jan;5(1):27-33.
- Feng H, Nakajima N, Wu L, Yamashita M, Lopes TJS, Tsuji M, Hasegawa H, Watanabe T, Kawaoka Y. A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective Immune Response to the Current Split Influenza Vaccine in Mice. *Front Microbiol.* 2019 Sep 18; 10:2157.
- doi: 10.3389/fmicb.2019.02157
- Adachi Y, Tonouchi K, Nithichanon A, Kuraoka M, Watanabe A, Shinnakasu R, Asanuma H, Aina A, Ohmi Y, Yamamoto T, Ishii KJ, Hasegawa H, Takeyama H, Lertmemongkolchai G, Kurosaki T, Ato M, Kelsoe G, Takahashi Y. Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies. *Nat Commun.* 2019 Aug 28;10(1):3883.
- doi:10.1038/s41467-019-11821-6
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- 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 Jan 20.

- doi: 10.1111/1348-0421.12775.
  - 高下恵美、森田博子、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、長谷川秀樹、市川正孝、三田村敬子、安倍隆、山崎雅彦 全国地方衛生研究所. バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播 IASR vol.40 , 197-199
  - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. , 71(3), 234-238, 2018
  - Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks. Archives of Virology 164(2), 535-545, 2018
  - Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. Antiviral Res., 157 , 38-46 , 2018
  - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. , 6;9, 3026, 2018
  - Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM. Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam. Influenza Other Respir Viruses. , 13(3) , 248-261 , 2018
  - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. , 24(3), 2019
  - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
  - Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T Development and Evaluation of New Real-time RT-PCR Assays for Identifying the Influenza A Virus Cluster IV H3N2 Variant. Jpn J Infect Dis. , 72(2), 127-129, 2019
2. 学会発表
- 高下恵美、森田博子、永田志保、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、渡邊真治、長谷川秀樹、2018-19 シーズンにおける バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、9th Negative Strand Virus-Japan、2020 年 1 月、沖縄
  - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Morita H, Sugawara H, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of

circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月、東京

- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamasaki M, Watanabe S, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月、東京
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月、東京
- 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹 : 2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬パロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況 第 51 回日本小児感染症学会学術集会 2019 年 10 月
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. Options X for the control of influenza. (Singapore) 2019.8.
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月
- Asanuma H, Ainai A, Ujike M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Nagata N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M. Increased pathogenicity in mice of a mouse-adapted influenza H7N9 virus was associated with delayed host innate immune responses. 6th International Influenza meeting (Munster, Germany) 2018.9.
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. The 6th ISIRV-AVG Conference (Washington DC, USA), Nov/2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus

Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018

- ・ 渡邊真治、桑原朋子、高下恵美、白倉雅之、藤崎誠一郎、三浦秀佳、秋元未来、中村一哉、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、菅原裕

美、小田切孝人 鶏卵分離埼玉株 NA で認められたアミノ酸変異の生物学的意義 第 32 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2018 年 6 月

・  
**G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし