

## 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。さらに呼吸器系ウイルスを対象としたインフルエンザ様疾患（ILI）のサーベイランスに関する基盤研究を行った。

また全国レベルの包括的で円滑な公衆衛生対策に貢献するため、病原体ゲノムサーベイランスの体制整備に不可欠な情報を収集した。

新型コロナウイルス PCR 検査法（感染研法）は、一部の株でやや感度の低下や波形の変化が見られたが、十分な感度を保持していた。培養細胞とマウスの実験で、変異株の S 蛋白の変化と細胞への感染経路の変化を明らかにした。

### 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。

- (4) インフルエンザ様疾患（ILI）サーベイランスの基盤研究を行う。
- (5) 包括的病原体ゲノムサーベイランスの整備
- (6) 新型コロナウイルス検査法、ウイルス学的特徴に関する研究を行う。

### B. 研究方法

- ヒトの上気道由来である鼻中隔扁平上皮株化細胞（RPMI2650 細胞）における季節性

インフルエンザウイルスの継時的な増殖について、従来使われている MDCK (hCK) 細胞のそれと比較した。

- 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。
- 2020/21, 2021/22 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。
- 国内外における薬剤耐性株検出を実施した。
- 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、2021-2022 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。
- 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した SARS-CoV-2 Genome Surveillance JAPAN の既存プラットフォームを有効利用し、地方衛生研究所が利活用しやすいよう、病原体ごとに特化した SOP 作成や各種病原体のゲノム情報解析サイトの充実を図っていく。
- ウイルスの変異に対する核酸検出系の評価を行った。
- 改良及び SARS-CoV-2 の性質評価培養細胞での評価を行った。

(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 ウイルス増殖については赤血球凝集反応で測定した。その結果、hCK 細胞では感染後

24 時間で赤血球凝集が確認されたが、RPMI2650 細胞では検出されなかった。このことから、RPMI2650 細胞では、hCK 細胞と比較して、増殖の速さが遅いことが示唆された。

- ② 近年の A/H3N2 亜型株は HA への糖鎖付加の影響を受け赤血球凝集活性が極めて低く、HI 試験を用いた抗原性解析に供試できない状況であったが、現在流行を拡げてきている遺伝子グループ 3C. 2a1b. 2a2 に属する株は赤血球凝集活性消失の原因となっている糖鎖が脱落しており、赤血球凝集活性を再獲得していることが本研究を通じて明らかとなった。
- ③ A (H1N1) pdm09 ウイルス : HA 遺伝子系統樹上で、近年の流行株は S183P アミノ酸置換を含む 6B. 1A から派生した複数の群の一つで N260D を特徴として有する 6B. 1A. 5a に属する。
- ④ A (H3N2) ウイルス : ほとんどの株が HA 遺伝子系統樹上の 3C. 2a1 (N171K+I406V+G484E) 内の 3C. 2a1b (N121K+K92R+H311Q) に属した。3C. 2a1b 内では多くが、分岐した 3C. 2a1b. 2 (T131K, V529I, K83E, Y94N, I522M) に属した。さらに、3C. 2a1b. 2 は 3C. 2a1b. 2a (K83E, Y94N, F193S, Y195F, I522M) と 3C. 2a1b. 2b (Q197R, S219F, V347M, E484G) に分岐した。
- ⑤ B 型ウイルス : Yamagata 系統は国内外含め報告されていない。Victoria 系統の分離株は、B/Brisbane/60/2008 株を代表とする V1A に属し、V1A. 3 (3 アミノ酸 (162-164 位) 欠損+K136E) 内の V1A. 3a (N150K, G184E, N197D, R279K) に属する株がほとんどであった。
- ⑥ 日本、ネパール、ミャンマーおよびラオスの季節性インフルエンザウイルス分離株及び国内分離 A (H5), A (H7), A (H9) 鳥インフルエンザウイルスについて解析を行った。その結果、すべての試験株は国内承認薬に対

して感受性を示した。

- ⑦ 成人層におけるワクチン接種後の 40 倍以上の抗体価保有率は、A/H1N1pdm09 が 54.1%、A/H3N2 が 32.7%、B 山形系統が 56.1%、B ビクトリア系統が 65.3%であった。4 系統すべてで EMEA が定める有効な抗体価の基準である 70%に達しなかった。
- ⑧ 高齢者層ではワクチン接種後の 40 倍以上の抗体価保有率は、A/H1N1pdm09 が 35.0%、A/H3N2 が 35.0%、B 山形系統が 27.5%、B ビクトリア系統が 62.5%であった。EMEA の定める高齢者の国際基準の 60%を越したワクチン株はB/ビクトリア系統のみであり、残りの A 型 2 亜型と B/山形は国際基準に達していなかった。
- ⑨ 現在、SARS-CoV-2 ゲノム解読の標準作業手順書 SOP 作成および地方衛生研究所を対象に技術研修会を実施し（のべ 90 箇所、計 9 回）、現場主体でゲノム情報取得が可能となっている。インフルエンザウイルスや RS ウイルス等の主要呼吸器ウイルスへの拡張や充実も期待される。
- ⑩ SARS-CoV-2 プライマーN2 および S2 セットについて、GISAID に登録されている SARS-CoV-2 を用いてミスマッチ検索を行い、特徴的なミスマッチと由来国のピックアップ、それらの検出感度への影響の検討を行った。
- ⑪ 培養細胞（in vitro）における実験で、SARS-CoV-2 アルファ変異株、デルタ変異株がフーリンによる S タンパクの開裂性が高まることによって、TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を効率良く利用できる性質を獲得していることが明らかになった。一方、オミクロン株については、TMPRSS2 を介した細胞への早期侵入経路を利用する能力は低く、エンドサイトーシスで細胞へ侵入しカテプシンの活性を使って感染することが明らかになった。TMPRSS2 ノックアウトマウスを用いた実験では、その結果の

一部を補強するデータを得ることができた。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Takashita E, Morita H, Nagata S, Shirakura M, Fujisaki S, Miura H, Takayama I, Arita T, Suzuki Y, Yamaoka M, Tanikawa T, Tsunekuni R, Mine J, Sakuma S, Uchida Y, Shibata A, Iwanaka M, Kishida N, Nakamura K, Kageyama T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Antiviral susceptibilities of avian influenza A(H5), A(H7), and A(H9) viruses isolated in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2021 Dec 28. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.751.
- Kotani O, Suzuki Y, Saito S, Ainai A, Ueno A, Hemmi T, Sano K, Tabata K, Yokoyama M, Suzuki T, Hasegawa H, Sato H. Structure-Guided Creation of an Anti-HA Stalk Antibody F11 Derivative That Neutralizes Both F11-Sensitive and -Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *Viruses.* 2021 Aug 31;13(9):1733. doi: 10.3390/v13091733.
- Miyauchi K, Adachi Y, Tonouchi K, Yajima T, Harada Y, Fukuyama H, Deno S, Iwakura Y, Yoshimura A, Hasegawa H, Yugi K, Fujii SI, Ohara O, Takahashi Y, Kubo M. Influenza virus infection expands the breadth of antibody responses through IL-4 signalling in B cells. *Nat Commun.* 2021 Jun 18;12(1):3789. doi: 10.1038/s41467-021-24090-z.

## 2. 学会発表

シンポジウム 2「風邪のコロナウイルスと小児の COVID-19-インフルエンザを含めて」ーインフルエンザの病理病態，長谷川秀樹，第 62 回日本臨床ウイルス学会，2021/6/13，国内，口頭.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし