

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流行する季節性インフルエンザウイルス及び発生した場合の新型インフルエンザウイルスの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及び新型コロナ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宿主側の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となりうる動物由来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、プレパンデミック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。

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

- ・ シーズンに国内および海外から収集した分離株または臨床検体について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、遺伝子系統樹解析を実施した。
- ・ ネパールとラオスで採取された臨床検体から分離した株および国内分離株のA(H1N1)pdm09とB Victoria系統のインフルエンザウイルスについて、フェレット感染血清をもちいたHI試験による抗原性解析を行った。
- ・ C型・D型インフルエンザウイルスを対象として、A型・B型インフルエンザウイルスと同様のFocus reduction assayを確立し、6系統のC型インフルエンザウイルスおよび4系統のD型インフルエンザウイルスの代表株について、バロキサビルおよびファビピラビルに対する感受性試験を実施し、IC50値を算出した。
- ・ 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、年齢、昨シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。2022-2023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、採血しワクチン接種前後の抗体価を HI 法にて測定した。

- ・ 国内分離高病原性鳥インフルエンザ H5 ウイルス株を発育鶏卵を用いて増殖させ、七面鳥赤血球 (TRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ワーキングストックを作製した。
- ・ 国立病院機構三重病院、三重県保健環境研究所ならびに協力病院において、ILI を呈した患者から鼻咽頭拭い液もしくは鼻汁を採取した。採取後の臨床検体は、核酸抽出ならびにリアルタイム PCR 法による病原体検出検査を実施した。三重県と埼玉県で行われていた病原体サーベイランスデータから地域の流行状況の評価を行った。同時に厚生労働省／国立感染症研究所から提供をうけた個人情報削除後の HER-SYS データによって全国での定点設定毎の推計値の評価を行い、ご協力頂いた地方自治体のデータにて定点医療機関からの報告数と全数報告データとの一致性を調査した。三重県で施行されている ILI サーベイランスのデータを使用し、また相模原市にて行われた試行によりその有用性を評価した。協力自治体における独自の入院サーベイランスの状況を調査した。
- ・ ウイルス液混合・非混合下で一定時間経過後のビーズの凝集像ないし沈降像を観察し、視認性の良否に基づき PA/PAI 試験実施に至適なビーズ径、ビーズ液懸濁濃度および静置反応時間を決定した。

(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 A(H1N1)pdm09 ウイルス：近年の流行株は HA 遺伝子系統樹内の 6B. 1A. 5a (アミノ酸置換 N129D, T185I) に属し、6B. 1A. 5a は更に 6B. 1A. 5a. 1 (D187A, Q189E) と 6B. 1A. 5a. 2 (K130N, N156K, L161I, V250A, E506D) (代表株 A/Victoria/1/2020) に分岐している。また 6B. 1A. 5a. 2 内では、6B. 1A. 5a. 2a (K54Q, A186T, Q189E, R259K, K308R) が、そして更に 6B. 1A. 5a. 2a. 1 (P137S, K142R, E224A, D260E, T277A, E356D, I418V, N451H) のサブクレードが派生し、これらが流行の中心となっている。NA タンパク質に H275Y を有するオセルタミビル耐性株の流行は確認されていない。
- ② A(H3N2) ウイルス：最近の流行株は、HA 遺伝子系統樹上のクレード 3C. 2a1b. 2a (K83E, Y94N,

T131K, I522M, V529I) 内に属している。3C. 2a1b. 2a 内には 3C. 2a1b. 2a. 1 (F193S, Y195F, G186S, S198P) および 3C. 2a1b. 2a. 2 (F193S, Y195F, Y159N, T160I, L164Q, G186D, D190N) が派生している。流行の中心である 3C. 2a1b. 2a. 2 内では更に、3C. 2a1b. 2a. 2a (H156S) (省略名：2a、代表株 A/Darwin/9/2021)、3C. 2a1b. 2a. 2b (E50K, F79V, I140K) (省略名：2b)、3C. 2a1b. 2a. 2c (S205F, A212T)、3C. 2a1b. 2a. 2d (G62R, H156Q, S199) が分岐している。国内流行株では、2022 年 7~8 月は 2a 内で D53N, P289S, R307K を持つウイルスが主流であったが、2022 年 9 月以降は 2a. 3a (39. 7%)、2a. 3a. 1 (16. 4%)、2b (26. 0%) に属するウイルスが主流となっている。

- ③ B 型ウイルス：HA 遺伝子系統樹上のクレード V1A. 3 [K136E+3 アミノ酸欠損 (162~164 番アミノ酸)] 内に V1A. 3a (G184E, N197D, R279K) が派生し、さらに V1A. 3a. 1 (V220M, P241Q) および V1A. 3a. 2 (A127T, P144L, K203R、代表株 B/Austria/1359417/2021) が分岐している。解析株は全て V1A. 3a. 2 に属し、D197E または A202V を有するグループに属した。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、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。
- ④ A(H1N1)pdm09：2022/23 シーズンワクチン接種者血清を用いた解析では、成人層は 2022 南半球ワクチン株 5a. 2a の A/Sydney/5/2021 株とよく反応したが、高齢者層は反応性が低下した。海外のワクチン接種者の血清は高齢者層だけでなく成人層も低下する傾向にあった。N156K, L161I, A186T, Q189E, P137S, K142R を持つ 5a. 2a. 1 のウイルス A/Norway/25089/2022 とは成人層、高齢者層ともに反応性が大きく低下した。成人層、高齢者層とも 2020/21 シーズンワクチン株 5a. 1 グループのウイルスともよく反応したが、海外のワクチン接種者血清のうち小児の血清では、5a. 1 のウイルスに対して低い反応性を示した。
- ⑤ B Victoria 系統：フェレット血清を用いて HI 試験により抗原性解析をしたいずれの株も、2022/23 シーズンのワクチン株のオリジナル株である B/Austria/1359417/2021 細胞分離株 (1A. 3a. 2) のフェレット血清とはよく反応した。しかしながら、ワクチン製造株の B/Austria/1359417/2021 (BVR-26) のフェレット感染血清とは反応性が低下する株が多かった。
- ⑥ 解析したすべての C 型・D 型インフルエンザウイルス分離株は、バロキサビルおよびファビピラビルに対して A 型・B 型インフルエンザウイ

ルスと同様の IC50 値を示した。これらの結果から、両薬剤が C 型・および D 型インフルエンザウイルスに対しても有効である可能性が示唆された。

- ⑦ 成人層におけるワクチン接種後の 40 倍以上の抗体保有率は、A/H1N1pdm09 が 24.5%、A/H3N2 が 36.2%、B/山形系統が 87.2%、B/ビクトリア系統が 68.1%であった。B/山形系統については接種前から 40 倍以上の抗体保有率が 70%に達していた。A 型の 2 亜型 A/H1N1pdm09、A/H3N2 の免疫原性は前年度と同様に低く、特に A/H1N1pdm09 はワクチン株が変わっていないが前年度と比べても抗体保有率が低かった。
- ⑧ 高齢者層ではワクチン接種後の 40 倍以上の抗体保有率は、A/H1N1pdm09 が 26.2%、A/H3N2 が 33.3%、B/山形系統が 64.3%、B/ビクトリア系統が 69.0%であった。前年度は A 型の 2 亜型 A/H1N1pdm09、A/H3N2 に加え、B/山形系統についても免疫原性が低かったが、本年度は B/山形系統については保有率が高まった。
- ⑨ 抗体陽転率は、成人層では、A/H1N1pdm09 が 9.6%、A/H3N2 が 27.7%、B 山形系統が 14.9%、B ビクトリア系統が 48.9%であった。高齢者層では A/H1N1pdm09 が 16.7%、A/H3N2 が 38.1%、B 山形系統が 28.6%、B ビクトリア系統が 52.4%であった。成人層と同様に B ビクトリア系統のみが国際基準に達した。高齢者層ではワクチン接種後の 40 倍以上の抗体保有率は、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。
- ⑩ 新型コロナウイルスに対する抗 WK-521 血清は TY38-873、TY38-871、TY40-385 株に対して低い PAI 価を示した。抗 TY38-873 血清、抗 TY40-385 血清の WK-521 株に対する PAI 価はそれぞれの相同 PAI 価に比して低く、株間の抗原性差異が明瞭に認められた。WK-521 は SARS-CoV2 出現初期の分離株であり、TY38-873、TY38-871、TY40-385 株はオミクロン系統株であることから、オミクロン系統株は出現初期の分離株から抗原性が大きく変化していることが確認できた。アルファ系統株は初期分離株からあまり抗原性が変化しておらず、ベータ、デルタ系統株に抗原性変化の傾向が認められている。またオミクロン系統株間でも BA.1 グループの TY38-873 株と BA.2 グループの TY40-385 株で互いに相同 PAI 価からの低値を示しており、BA.1 グループ株と BA.2 グループ株で抗原性変化が生じていることが示唆された。
- ⑪ 2022 年 11 月までに採取された ILI 検体 879 例

について病原体検出検査を実施し、そのうち、867 検体で検査結果が有効となった。検査した病原体のうち、FLUA、FLUB、A/H1N1pdm、HCoV 229E、HPIV2、M. pneum、C. pneum、Hib は期間中に 1 回も検出されなかった。検査数は、2022 年 7~8 月に多くなったが、この期間は RSV、SARS-CoV-2、HPIV1、HBoV の検出数が増加していた。検査数が多かった 2022 年 7~8 月は、RSV の陽性率の急上昇が見られた。また、最も検出数が多い HRV の陽性率は、春と秋の 2 回上昇が見られ、HMPV は RSV や SARS-CoV-2 の陽性率が下降し始めた秋以降に上昇が見られた。

- ⑫ 患者の年齢グループ別のウイルス検出数を解析した。患者を 2 歳未満、2 歳以上 15 歳未満の 2 群に分け、各ウイルスの検出数が群間で差があるか検討した。HRV、HPIV1、HBoV、RSV の 4 ウイルスで 2 歳以上 15 歳未満の群と比較し、2 歳未満の群で有意に検出数が多かった ($p < 0.05$)。
- ⑬ 性別間でウイルス検出数に差が見られるか検討したところ、HRV が男性で有意に検出数が多く ($p = 0.007$)、HPeV が女性で有意に検出数が多かった ($p = 0.047$)。
- ⑭ 三重県と埼玉県の流行状況を評価した。同時に全国での定点設定毎の推計値の評価を行い、ご協力頂いた地方自治体のデータにて定点医療機関からの報告数と全数報告データとの一致性を調査した。三重県での ILI データ及び、相模原市にて行われた試行により、その有用性を評価した。協力自治体における独自の入院サーベイランスの状況調査から、今後の入院症例の情報収集について検討し、提言とした。情報収集の負荷軽減のための電子カルテからの抽出ツールを試作・試行した。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Murakami S, Matsuzaki Y, Fujisaki S, Morita H, Nagata S, Katayama M, Mizuta K, Nishimura H, Watanabe S, Horimoto T, Hasegawa H. Antiviral Susceptibilities of Distinct Lineages of Influenza C and D Viruses. *Viruses*. 2023 Jan 15;15(1):244. doi: 10.3390/v15010244.
- Takashita E, Watanabe S, Hasegawa H, Kawaoka Y. Are twindemics occurring? *Influenza Other Respir Viruses*. 2023 Jan;17(1): e13090. doi: 10.1111/irv.13090.
- Jun Kobayashi, Shutoku Matsuyama, Masayuki Shirakura, Tomoko Arita, Yasushi Suzuki, Hideki Asanuma, Shinji Watanabe, Hideki Hasegawa, Kazuya Nakamura, Use

of the particle agglutination/particle agglutination inhibition test for antigenic analysis of SARS-CoV-2. *Influenza Other Respir. Viruses*, 17(2) e13093, 2023

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

2. 学会発表

- ・ Influenza: Mechanisms of Vaccine Induced and Broadly Protective Adaptive Immunity Hideki Hasegawa. *Options XI for the Control of Influenza*, 2022/9/28, 海外, 口頭
- ・ 「2021/22シーズンにおけるインフルエンザ流行株の性状と 2022/23 シーズンのワクチン株選定について」渡邊真治 岸田典子 藤崎誠一郎 中村一哉 白倉雅之 高下恵美 佐藤彩秋 元未来 三浦秀佳 森田博子 永田志保 菅原裕美 長谷川秀樹 インフルエンザ株サーベイランスグループ (国立感染症研究所、地方衛生研究所、保健所および医療機関) 第 69 回日本ウイルス学会学術集会 2022/11/15, 国内, 口頭
- ・ 「遺伝的安定性と抗原性を維持した細胞培養季節性インフルエンザワクチン製造株の作製検討」高橋仁 藤崎誠一郎 三浦秀佳 永田志保 浜本いつき 中内美名 信澤枝里 長谷川秀樹 第 69 回日本ウイルス学会学術集会 2022/11/13-15, 国内, ポスター