

1. インフルエンザウイルスの NA 蛋白質に対する抗体と感染防御

山吉 誠也, 安原 敦洋

東京大学医科学研究所ウイルス感染分野

インフルエンザウイルスに感染しないためには、ウイルスとの接触を避けることが最優先である。しかし、ウイルスは目に見えないため、ウイルスとの接触を完全に回避することは困難である。そこで、ウイルスの増殖を抑制する抗体を十分に持っていれば、たとえウイルスに曝露したとしてもインフルエンザを発症しないだろう。これまで、ウイルスの赤血球凝集活性を抑制する抗体がヒトの体内でのウイルス増殖抑制に中心的な役割を果たすとされてきたため、そのような抗体を誘導することが予防の基本とされてきた。近年のヒトモノクローナル抗体の研究から、抗体によるウイルス増殖の抑制メカニズムの多様性が明らかとなってきた。本稿では、注目を集めているウイルスの NA 蛋白質に対する抗体による感染防御について、NA 蛋白質の基礎的な役割、NA 蛋白質に対する抗体による増殖抑制メカニズム、現行のワクチンにおける改善点などについて解説したい。

1. インフルエンザウイルスの NA 蛋白質の構造と機能

A 型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 蛋白質は、アミノ酸配列の類似性に基づき、11 の NA 亜型 (N1 から N11) からなる 3 つのグループ (グループ 1: N1, N4, N5 および N8 亜型, グループ 2: N2, N3, N6, N7 および N9 亜型, グループ 3: N10 および N11 亜型)¹⁾ に分類される (図 1)。同様に B 型インフルエンザウイルスの NA 蛋白質も 2 つの系統 (Yamagata 系統と Victoria 系統) に分類されていたが、現在流行している全ての B 型インフルエンザウイルスは Yamagata 系統を由来とする NA 分節を保持している²⁾。

NA 蛋白質は、構造的に Head 領域、Stalk 領域、細胞膜貫通領域および細胞質内領域の 4 つの領域からなる単量体 NA 蛋白質が 4 つ集まったホモ 4 量体である。NA 蛋白質のシアリダーゼ活性部位は、Head 領域にある。HA 蛋白質が受容体であるシアル酸との結合や Uncoating を担

うのに対し、シアリダーゼ活性を持つ NA 蛋白質は、子孫ウイルス粒子が細胞表面から放出される時に、細胞表面のシアル酸と結合してしまった HA 蛋白質からシアル酸を切断し、子孫ウイルス粒子を宿主細胞から遊離させる働きがある (図 2)。ただし、コウモリで見つかった N10 および N11 亜型のインフルエンザウイルスが持つ NA 蛋白質はシアリダーゼ活性を持たず、その機能は未だ明らかでない。しかし、特定の条件下において、重要な役割を發揮することを示唆するデータが報告されている³⁾。ヒトで流行している A 型および B 型インフルエンザウイルスの NA 蛋白質はウイルスの効率的な増殖に必須な機能を有しているため、抗ウイルス薬の良いターゲットとなっている。実際、病院で多く使用されている抗インフルエンザ薬であるオセルタミビル、ザナミビル、イナビルおよびペラミビルは、NA 蛋白質のシアリダーゼ活性を阻害する NA 阻害薬である。

2. NA 蛋白質の抗原性変化と抗体によるウイルス増殖の阻害

ヒトの間で流行しているヒトインフルエンザウイルスの NA 蛋白質の抗原性は、HA 蛋白質における抗原性と同様に、アミノ酸変異の蓄積により徐々に変化している^{4,5)}。その主要な原因となっているのは、ヒトの体内においてインフルエンザウイルスの増殖抑制活性を持つ抗 NA 抗体である。以下に NA 蛋白質に対する抗体が持つ 2 つのウイルス増殖抑制メカニズムとそれらの抗体の認識部位について説明する。

連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台 4-6-1

東京大学医科学研究所ウイルス感染分野

TEL: 03-5549-5502

FAX: 03-5449-5408

E-mail: yamayo@ims.u-tokyo.ac.jp

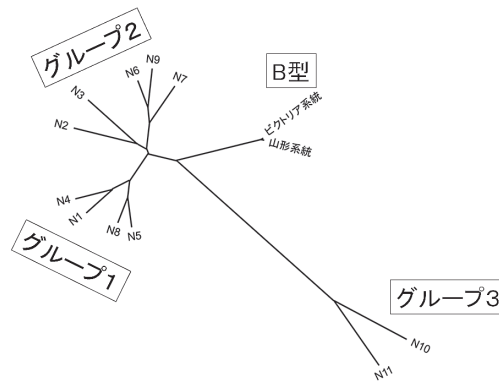


図1 NA蛋白質の系統樹

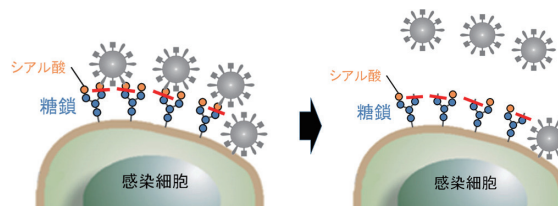


図2 NA蛋白質の機能

① NA蛋白質のシアリダーゼ活性を阻害する抗体

ウイルスの増殖を抑制する抗NA抗体の多くは、NA蛋白質の最も重要な機能を担うシアリダーゼ活性部位の周辺に結合し、シアリダーゼ活性を阻害する⁶⁾。このようなシアリダーゼ活性阻害能を持つ抗体を総称して、Neuraminidase Inhibition (NI) 抗体と呼んでいる。NI抗体は、直接的または間接的にNA蛋白質のシアリダーゼ活性を阻害する。直接的な阻害は、抗体がシアリダーゼ活性部位に直接結合することで起こる⁷⁾。NA蛋白質のシアリダーゼ活性部位の構造はA型およびB型の間で良く保存されているため、シアリダーゼ活性部位を直接認識する抗体には、A型のN1からN9亜型のウイルス並びにB型の山形系統およびビクトリア系統のウイルスの増殖を阻害出来る抗体も存在する⁷⁾。このシアリダーゼ活性部位は、構造的なフレキシビリティが極めて低いため、アミノ酸変異が起こりづらい特徴がある。間接的な阻害は、抗体がシアリダーゼ活性部位の周辺に結合することで、シアリダーゼ活性部位に基質であるシアル酸が近づけなくなるにより起こる⁸⁾。このようなNI抗体による増殖阻害を避けるため、NA蛋白質のシアリダーゼ活性部位周辺にはアミノ酸変異が高頻度に起こる^{9, 10)}。実際、H1N1pdm09亜型、H3N2亜型、B型ビクトリア系統、B型山形系統にそれぞれ分類されたヒトインフルエンザウイルスのNA蛋白質のHead領域におけるアミノ酸変異の頻度を立体構造上にマップすると、赤色で示したシアリダーゼ活性部位の周辺

にアミノ酸変異の頻度が高い箇所が多くみられる(図3)。つまり、ウイルスの増殖を抑制することが出来るNI抗体がNA蛋白質のシアリダーゼ活性部位の周辺におけるアミノ酸変異を起こし、それによりNA蛋白質の抗原性が変化するということである。その他に、HA蛋白質を認識する抗体が、間接的にNA蛋白質のシアリダーゼ活性を阻害することも報告されている^{11, 12)}が、それに関する説明はここでは省略したいと思う。

②エフェクター細胞の活性化を引き起こす抗体

これまでのNA蛋白質に対するモノクローナル抗体の解析では、上記のようなNI活性を持つ抗体の解析に注力してきた¹³⁻¹⁵⁾。そのため、NA蛋白質のエピトープの多くは、Head領域のシアリダーゼ活性部位周辺に存在するとされてきた。しかし図3を見ると、シアリダーゼ活性部位から離れたHead領域の側面にも、アミノ酸変異が高頻度に起きている箇所がある¹⁶⁾。このようなシアリダーゼ活性部位から離れた場所を認識する抗体はNI活性を持たないと考えられるため、高頻度なアミノ酸変異がどのような理由で起こっているかは明らかでなかった。最近、我々の研究からNA蛋白質のHead領域の側面を認識するNI活性を持たないヒト抗NA抗体が、in vitroではウイルスの増殖を抑制しないものの、in vivoでは感染防御活性を示すことが分かった¹⁷⁾。さらに、このin vivoにおける感染防御活性には、抗体のFc領域を介した好中球、マクロファージ、Natural Killer (NK) 細胞などのエフェクター細胞の活性

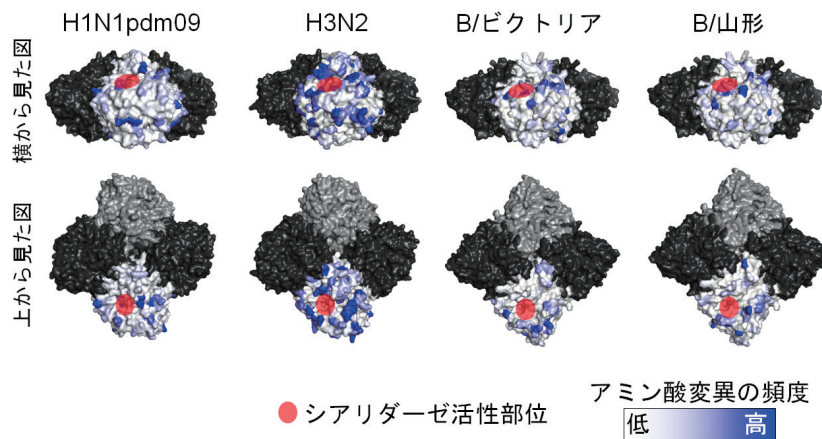


図3 NA蛋白質に見られるアミノ酸変異

表1 感染防御と関連する抗体の種類

実施期間 (方法)	実施国	対象者数 と年齢	対象 (亜) 型	検討した抗体価の種類	感染防御との相関	論文の PMID
2007-08	アメリカ	171名 18-49歳	H3N2	HI抗体価, 中和抗体価, NI抗体価	HI抗体価 = 中和抗体価 > NI抗体価の順で 感染防御と相関	25858957
2008-09	カナダ	656名 3-15歳	H1N1, H3N2	HI抗体価, 中和抗体価	中和抗体価の方が感染防御とより良い相関	26107625
2008-09	ベトナム	940名 0-90歳	H1N1, H1N1pdm, H3N2, B	HI抗体価	H3N2とBではHI抗体価と感染防御に相関	25224643
2011-12	アメリカ	673名 65歳以上	H3N2	HI抗体価, 中和抗体価, NI抗体価	HI抗体価 = 中和抗体価 > NI抗体価の順で 感染防御と相関	26762363
ヒトでの 感染実験	アメリカ	65名 18-50歳	H1N1pdm	HI抗体価, NI抗体価	NI抗体価と感染防御に相関	27094330
2008-09	カナダ	732名 3-15歳	H3N2	一元放射状拡散溶血反応抗体価, HI抗体価, 中和抗体価	HI抗体価および中和抗体価に感染防御との 相関	28218983
ヒトでの感 染実験	アメリカ	65名 18-50歳	H1N1pdm	HI抗体価, NI抗体価, 抗HA stem抗体価	NI抗体価と感染防御に相関	29362240
2013, 2015	ニカラグア	170名 0-80歳	H1N1pdm	HI抗体価, 抗NA抗体価, 抗HA stem抗体価	抗NA抗体価が症状の軽減と相関	31300819
2013, 2015	ニカラグア	300名 0-85歳	H1N1pdm	HI抗体価, 抗HA抗体価, 抗HA stem抗体価, 抗NA抗体価	HI抗体価, 抗HA抗体価, 抗HA stem抗体 価がそれぞれ感染防御と相関	31160818

化が必要であることも明らかにした¹⁷⁾。NK細胞、マクロファージおよび好中球は、Fc γ RIIIa¹⁸⁾やFc γ RIIa^{19, 20)}を介してウイルス感染細胞に結合した抗体を認識することで活性化し、NK細胞のAntibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) 活性、マクロファージのAntibody-Dependent Cellular Phagocytosis (ADCP) 活性、または好中球のAntibody-Dependent Neutrophil-mediated Phagocytosis (ADNP) 活性^{21, 22)}によりウイルス感染細胞を排除することで、ウイルスの増殖を抑制する。このようなエフェクター細胞の活性化によりウイルス増殖を抑制する抗体が認識するHead領域の側面に起きたアミノ酸変異により、NA蛋白質の抗原性が変化していることも確認した¹⁷⁾。つまり、NI活性を持たないHead領域の側面を認識する抗体がエ

フェクター細胞の活性化を介してウイルスの増殖を阻害するため、この増殖抑制活性から逃れるためNA蛋白質のシアリダーゼ活性部位から離れた領域においてアミノ酸変異が高頻度で起こり、そのアミノ酸変異が抗原性変化につながっている。

以上より、シアリダーゼ活性部位の周辺を認識する抗NA抗体はNI活性により感染防御に寄与し、Head領域の側面を認識するNI活性を持たない抗NA抗体はエフェクター細胞の活性化を介して感染防御に寄与すると言える。しかし、NI活性を持つ抗NA抗体には、エフェクター細胞の活性化を介して感染防御に寄与する抗体も報告されている²³⁾。よって、抗NA抗体による感染防御への寄与を評価する場合、NI活性とエフェクター細胞の活性化の両

方を加味する必要がある。

3. 感染防御抗原としてのNA蛋白質

1960年代から、NA蛋白質に対する抗体がインフルエンザウイルスの増殖を抑制することは広く知られていた²⁴⁻²⁷。しかし、1972年に行われたヒトへの感染実験から、血清中の赤血球凝集抑制（HI）抗体価が1:40以上であると、インフルエンザ発症のリスクを50%減少させることが示された²⁸ことから、感染防御におけるHI抗体の重要性が注目された。その後も、HI抗体価と感染防御の関連性についての研究が多数行われ、HI抗体価がインフルエンザウイルスからの感染防御に相関する標準的な指標として使用されるようになった。一方、最近のヒトモノクローナル抗体の解析から、様々な亜型のA型インフルエンザウイルスに対して感染防御活性を示す抗HA Stem抗体やNI活性を持たない抗NA抗体による感染防御、感染防御におけるエフェクター細胞の重要性等が明らかとなった²⁹⁻³²。そこで、改めて感染防御と相関する抗体がどのような抗体なのかを調べる研究が行われた。その中から、2015年以降に発表された9つの論文³⁴⁻⁴²を表1にまとめた。これらの研究の結論は様々であり、どのような抗体が感染防御の主体をなしているのかを結論することは困難である。今後は、HI抗体価やNI抗体価のみでなく、エフェクター細胞の活性化能なども含めた多角的な検討を重ねることで、感染防御の主体となる抗体が同定されることを期待したい。それが判明すれば、効果の高いワクチンの開発につながる事が期待される。

一方で、感染防御と相関が認められた抗体がHI抗体だけでなく、中和抗体、NI抗体、抗HA stem抗体なども感染防御と相関することが報告されたことは注目に値する。特にNI活性を持つ抗NA抗体の量と感染防御の間に相関がみられたとする論文が複数報告された事は、近年、感染防御抗原として語られることがあまりなかったNA蛋白質の重要性を見直すきっかけとなるのではないだろうか。なぜならば、NA蛋白質の抗原性変化はHA蛋白質の抗原性変化よりも穏やかであるため、NA蛋白質を標的としたワクチンが開発できれば、抗原性変化を原因とするワクチン効果の低下に苦しむシーズンが少なくなる事が期待される。今後は、HA蛋白質だけでなく、NA蛋白質に対する抗体も効率良く誘導するワクチンの開発を検討していく必要があるのかもしれない。

この種の論文をいくつか読む中で、論文の結果を比較する上での2つの問題が見えてきた。1つ目は、抗体価の測定に用いるウイルス株の問題である。ワクチンに用いたワクチン株と実際に流行している流行株の間で、HA蛋白質の抗原性が異なることはたびたび起こる。このようなシーズンに実験を行った際、抗体価の測定にワクチン株と流行株のどちらを用いるかによって、結論が異なる可能性があ

る。また、流行株を用いる場合でも、同時期に抗原性の異なる流行株が混合流行していれば、どの抗原性の株を解析に用いるかで、結論に違いが出るかもしれない。2つ目は、抗体価を測定する方法が論文により少しずつ異なるため、同じ種類の抗体を測定したと記載してあっても、評価している抗体が厳密に同じだといえないことである。それにより、評価している抗体が感染防御と相関するかという結論に影響を与える可能性が否定できない。つまり、このような研究をそれぞれの研究機関で独自の基準・方法で実施するよりも、国際的な標準手法を確立し、その手法を共有することが出来れば、得られた結果の比較が容易になるだろう。これらを改善することにより、感染防御に必要な要因の同定により早くたどり着けるのではないかと思う。

4. インフルエンザワクチンにおけるNA蛋白質

現行のインフルエンザワクチンは、鶏卵の漿尿膜で増殖させたウイルスを精製後、エーテル等により脂質成分を除去した“スプリットワクチン”である⁴³。そのため、現行のインフルエンザワクチンには、主にHA蛋白質、NA蛋白質、M1蛋白質およびNP蛋白質が含まれる。スプリットインフルエンザワクチンはHA蛋白質に対する抗体応答を引き起こすことを主目的にしているため、HA蛋白質の含有量は厳密にコントロールされている。しかし、スプリットインフルエンザワクチンにおけるNA蛋白質の含有量は規定されていないため、NA蛋白質の含有量はコントロールされていない。そのため、製造した会社や製造ロットにより、NA蛋白質の含有量は異なっており^{44,45}、接種したスプリットワクチンのNA含有量に依存して、誘導されるNA蛋白質に対する抗体量にも違いが生じることになる⁴⁶。一方で、スプリットワクチン接種者と感染患者の間でNA蛋白質に対する抗体応答を比較すると、感染患者ではHA蛋白質に対する抗体応答と同程度のNA蛋白質に対する抗体応答が起こっていたものの、ワクチン接種者ではHA蛋白質に対する抗体応答がほとんどであったという報告もある⁴⁷。したがって、NA蛋白質に対する抗体応答を一定以上誘導するためには、正しい立体構造を保ったNA蛋白質を必要な量だけワクチンとして接種すれば良いと思われる。つまり、現行のスプリットインフルエンザワクチンにおいてNA蛋白質に対する抗体応答を高めるためには、ワクチンのNA蛋白質含有量を増やせば良い。感染防御抗原として重要だと再認識されつつあるNA蛋白質の存在が念頭にない現状のスプリットワクチンの製造過程で、NA蛋白質の量を逐一測定することがその第一歩となるだろう。また、NA蛋白質の構造安定性はあまり高くないため、スプリット化の過程で抗原性の低下が起こることも懸念される。したがって、NA蛋白質の含有量を一定以上に保つのみでなく、抗原性も維持するようなワクチン製造方法を検討する必要があるのかもしれない。NA蛋白質の含有量を

上昇させることが出来ない, または抗原性が著しく低下する場合には, 別途発現・精製したりコンビナント NA 蛋白質を添加することで, NA 蛋白質含有量を確保することも一つの手段である. 一方, NA 蛋白質の含有量を一定以上に保ち, 抗原性も損なわないための単純かつ効果的な方法は, ウイルス粒子を精製・不活化後, そのままワクチンに用いる全粒子ワクチンを採用することかもしれない. 全粒子ワクチンであれば, スプリット化過程での NA 蛋白質の喪失や抗原性低下の懸念が低いと考えられる.

5. おわりに

現行のスプリットインフルエンザワクチンには, 改善の余地が残されていることは明白である. 本稿では, NA 蛋白質に対する抗体がヒトでの感染防御に重要であることを中心に述べたが, NA 蛋白質に対する抗体応答のみを改善すれば, それで万事うまくいくとは思えない. HA 蛋白質に対する抗体応答, NP 蛋白質や M1 蛋白質に対する Cytotoxic T lymphocyte (CTL) の誘導, ワクチンの投与経路, アジュバントの添加等のあらゆる点を改善し, その最善の手法を組み合わせることでワクチン効果を最大化できる道が開けるのではないだろうか.

インフルエンザワクチンの究極の目標は, “ユニバーサルワクチン” の実現であろう. それに向けた最大の障壁となるであろう Original Antigenic Sin (Immunological Imprinting ともいわれる) を理解し, それを乗り越えるためには基礎研究を一步一步積み重ねることが大願の達成に向かう唯一の道であると信じて, 今後も研究がより一層進展することを切願する.

利益相反事項の開示

本稿に関連し, 開示すべき利益相反状態にある企業等はありません.

参考文献

- 1) Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. **Trends Microbiol** 22:183-91,2014.
- 2) Burnham AJ, Baranovich T, Govorkova EA. Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: efficacy and resistance. **Antiviral Res** 100:520-34,2013.
- 3) Ciminski K, Ran W, Gorka M, Lee J, Malmlov A, Schinkothe J, Eckley M, Murrieta RA, Aboellail TA, Campbell CL, Ebel GD, Ma J, Pohlmann A, Franzke K, Ulrich R, Hoffmann D, Garcia-Sastre A, Ma W, Schountz T, Beer M, Schwemmle M. Bat influenza viruses transmit among bats but are poorly adapted to non-bat species. **Nat Microbiol** doi:10.1038/s41564-019-0556-9,2019.
- 4) Gao J, Couzens L, Burke DF, Wan H, Wilson P, Memoli MJ, Xu X, Harvey R, Wrammert J, Ahmed R, Taubenberger JK, Smith DJ, Fouchier RAM, Eichelberger MC. Antigenic Drift of the Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Neuraminidase Results in Reduced Effectiveness of A/California/7/2009 (H1N1pdm09)-Specific Antibodies. **MBio** 10,2019.
- 5) Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, Xu X, Klimov AI, Russell CA, Burke DF, Smith DJ, Fouchier RA, Eichelberger MC. Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 108:20748-53,2011.
- 6) Gilchuk IM, Bangaru S, Gilchuk P, Irving RP, Kose N, Bombardi RG, Thornburg NJ, Creech CB, Edwards KM, Li S, Turner HL, Yu W, Zhu X, Wilson IA, Ward AB, Crowe JE, Jr. Influenza H7N9 Virus Neuraminidase-Specific Human Monoclonal Antibodies Inhibit Viral Egress and Protect from Lethal Influenza Infection in Mice. **Cell Host Microbe** doi:10.1016/j.chom.2019.10.003,2019.
- 7) Stadlbauer D, Zhu X, McMahon M, Turner JS, Wohlbold TJ, Schmitz AJ, Strohmeier S, Yu W, Nachbagauer R, Mudd PA, Wilson IA, Ellebedy AH, Krammer F. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. **Science** 366:499-504,2019.
- 8) Aymard M, Ferraris O, Gerentes L, Jolly J, Kessler N. Neuraminidase assays. **Dev Biol (Basel)** 115:75-83, 2003.
- 9) Air GM, Els MC, Brown LE, Laver WG, Webster RG. Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. **Virology** 145:237-48,1985.
- 10) Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. **Nature** 303:41-4,1983.
- 11) Kosik I, Angeletti D, Gibbs JS, Angel M, Takeda K, Kosikova M, Nair V, Hickman HD, Xie H, Brooke CB, Yewdell JW. Neuraminidase inhibition contributes to influenza A virus neutralization by anti-hemagglutinin stem antibodies. **J Exp Med** 216:304-316,2019.
- 12) Kosik I, Yewdell JW. Influenza A virus hemagglutinin specific antibodies interfere with virion neuraminidase activity via two distinct mechanisms. **Virology** 500: 178-183,2017.
- 13) Gulati U, Hwang CC, Venkatramani L, Gulati S, Stray SJ, Lee JT, Laver WG, Bochkarev A, Zlotnick A, Air GM. Antibody epitopes on the neuraminidase of a recent H3N2 influenza virus (A/Memphis/31/98). **J Virol** 76:12274-80,2002.
- 14) Lee JT, Air GM. Interaction between a 1998 human influenza virus N2 neuraminidase and monoclonal antibody Mem5. **Virology** 345:424-33,2006.
- 15) Nuss JM, Whitaker PB, Air GM. Identification of critical contact residues in the NC41 epitope of a subtype N9 influenza virus neuraminidase. **Proteins** 15:121-32, 1993.
- 16) Fanning TG, Reid AH, Taubenberger JK. Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions. **Virology** 276:417-23,2000.
- 17) Yasuhara A, Yamayoshi S, Kiso M, Sakai-Tagawa Y,

- Koga M, Adachi E, Kikuchi T, Wang IH, Yamada S, Kawaoka Y. Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus. **Nat Microbiol** 4:1024-1034,2019.
- 18) Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. **J Immunol** 130:2133-41,1983.
 - 19) Stuart SG, Simister NE, Clarkson SB, Kacinski BM, Shapiro M, Mellman I. Human IgG Fc receptor (hFc-RII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. **EMBO J** 8:3657-66,1989.
 - 20) Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int Immunopharmacol** 17:638-50,2013.
 - 21) Bournazos S, DiLillo DJ, Ravetch JV. The role of Fc- γ R interactions in IgG-mediated microbial neutralization. **J Exp Med** 212:1361-9,2015.
 - 22) Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, Fiebiger BM, Ravetch JV. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. **Nat Immunol** 15:707-16,2014.
 - 23) DiLillo DJ, Palese P, Wilson PC, Ravetch JV. Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. **J Clin Invest** 126:605-10,2016.
 - 24) Schulman JL, Khakpour M, Kilbourne ED. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. **J Virol** 2:778-86,1968.
 - 25) Jahiel RI, Kilbourne ED. Reduction in plaque size and reduction in plaque number as differing indices of influenza virus-antibody reactions. **J Bacteriol** 92:1521-34,1966.
 - 26) Kilbourne ED, Laver WG, Schulman JL, Webster RG. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. **J Virol** 2:281-8,1968.
 - 27) Downie JC. Neuraminidase- and hemagglutinin-inhibiting antibodies in serum and nasal secretions of volunteers immunized with attenuated and inactivated influenza B-Eng-13-65 virus vaccines. **J Immunol** 105:620-6,1970.
 - 28) Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. **J Hyg (Lond)** 70:767-77,1972.
 - 29) Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. **J Infect Dis** 204:1879-85,2011.
 - 30) Yamayoshi S, Yasuhara A, Ito M, Uraki R, Kawaoka Y. Differences in the ease with which mutant viruses escape from human monoclonal antibodies against the HA stem of influenza A virus. **J Clin Virol** 108:105-111, 2018.
 - 31) Yamayoshi S, Ito M, Uraki R, Sasaki T, Ikuta K, Kawaoka Y. Human protective monoclonal antibodies against the HA stem of group 2 HAs derived from an H3N2 virus-infected human. **J Infect** 76:177-185,2018.
 - 32) Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, Kiso M, Nakatsu S, Yasuhara A, Oishi K, Sasaki T, Ikuta K, Kawaoka Y. A Broadly Reactive Human Anti-hemagglutinin Stem Monoclonal Antibody That Inhibits Influenza A Virus Particle Release. **EBioMedicine** 17:182-191,2017.
 - 33) DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require Fc γ R interactions for protection against influenza virus in vivo. **Nat Med** 20:143-51,2014.
 - 34) Fox A, Mai le Q, Thanh le T, Wolbers M, Le Khanh Hang N, Thai PQ, Thi Thu Yen N, Minh Hoa le N, Bryant JE, Duong TN, Thoang DD, Barr IG, Wertheim H, Farrar J, Hien NT, Horby P. Hemagglutination inhibiting antibodies and protection against seasonal and pandemic influenza infection. **J Infect** 70:187-96,2015.
 - 35) Verschoor CP, Singh P, Russell ML, Bowdish DM, Brewer A, Cyr L, Ward BJ, Loeb M. Microneutralization assay titres correlate with protection against seasonal influenza H1N1 and H3N2 in children. **PLoS One** 10:e0131531,2015.
 - 36) Dunning AJ, DiazGranados CA, Voloshen T, Hu B, Landolfi VA, Talbot HK. Correlates of Protection against Influenza in the Elderly: Results from an Influenza Vaccine Efficacy Trial. **Clin Vaccine Immunol** 23:228-35,2016.
 - 37) Memoli MJ, Shaw PA, Han A, Czajkowski L, Reed S, Athota R, Bristol T, Fargis S, Risos K, Powers JH, Davey RT, Jr., Taubenberger JK. Evaluation of Anti-hemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model. **MBio** 7: e00417-16, 2016.
 - 38) Wang B, Russell ML, Brewer A, Newton J, Singh P, Ward BJ, Loeb M. Single radial haemolysis compared to haemagglutinin inhibition and microneutralization as a correlate of protection against influenza A H3N2 in children and adolescents. **Influenza Other Respir Viruses** 11:283-288,2017.
 - 39) Park JK, Han A, Czajkowski L, Reed S, Athota R, Bristol T, Rosas LA, Cervantes-Medina A, Taubenberger JK, Memoli MJ. Evaluation of Preexisting Anti-Hemagglutinin Stalk Antibody as a Correlate of Protection in a Healthy Volunteer Challenge with Influenza A/H1N1pdm Virus. **MBio** 9,2018.
 - 40) Maier HE, Nachbagauer R, Kuan G, Ng S, Lopez R, Sanchez N, Stadlbauer D, Gresh L, Schiller A, Rajabhathor A, Ojeda S, Guglia AF, Amanat F, Balmaseda A, Krammer F, Gordon A. Pre-existing anti-neuraminidase antibodies are associated with shortened duration of influenza A (H1N1)pdm virus shedding and illness in naturally infected adults. **Clin Infect Dis** doi: 10.1093/cid/ciz639,2019.
 - 41) Ng S, Nachbagauer R, Balmaseda A, Stadlbauer D, Ojeda S, Patel M, Rajabhathor A, Lopez R, Guglia AF, Sanchez N, Amanat F, Gresh L, Kuan G, Krammer F, Gordon A. Novel correlates of protection against pandemic H1N1 influenza A virus infection. **Nat Med** 25:962-967,2019.

- 42) Monto AS, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Liu M, Zhong W, Levine M, Katz JM, Ohmit SE. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. **J Infect Dis** 212:1191-9,2015.
- 43) Yamayoshi S, Kawaoka Y. Current and future influenza vaccines. **Nat Med** 25:212-220,2019.
- 44) Sultana I, Yang K, Getie-Kebtie M, Couzens L, Markoff L, Alterman M, Eichelberger MC. Stability of neuraminidase in inactivated influenza vaccines. **Vaccine** 32: 2225-30,2014.
- 45) Creskey MC, Li C, Wang J, Girard M, Lorbetskie B, Gravel C, Farnsworth A, Li X, Smith DG, Cyr TD. Simultaneous quantification of the viral antigens hemagglutinin and neuraminidase in influenza vaccines by LC-MSE. **Vaccine** 30:4762-70,2012.
- 46) Couch RB, Atmar RL, Keitel WA, Quarles JM, Wells J, Arden N, Nino D. Randomized comparative study of the serum antihemagglutinin and antineuraminidase antibody responses to six licensed trivalent influenza vaccines. **Vaccine** 31:190-5,2012.
- 47) Chen YQ, Wohlbold TJ, Zheng NY, Huang M, Huang Y, Neu KE, Lee J, Wan H, Rojas KT, Kirkpatrick E, Henry C, Palm AE, Stamper CT, Lan LY, Topham DJ, Treanor J, Wrammert J, Ahmed R, Eichelberger MC, Georgiou G, Krammer F, Wilson PC. Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. **Cell** 173:417-429 e10,2018.

Protective antibodies against influenza virus neuraminidase

Seiya YAMAYOSHI and Atsuhiko YASUHARA

Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

To avoid influenza virus infection, antibodies that inhibit influenza virus propagation should be elicited by vaccination. Because the hemagglutination-inhibition titer is considered as an immunological correlate of protection against influenza virus infection, most of the current vaccines target the induction of such antibodies. Recent studies on human monoclonal antibodies have revealed the multiple mechanisms of virus growth inhibition by human antibodies against various virus proteins. One of the most attractive findings is protective antibodies against viral NA protein. Here, we would like to summarize the basic information of NA protein, suppression of virus propagation by anti-NA antibodies, and improvement of the current inactivated influenza vaccine.

