

厚生省
平成11年度

平成11年度厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

パンデミー・間パンデミーインフルエンザの
サーベイランスに関する調査研究

平成12年3月
主任研究者 根路銘 国昭
国立感染症研究所ウイルス一部
呼吸器系ウイルス研究室

パンデミー・間パンデミーインフルエンザのサーベイランスに関する調査研究

平成 11 年度研究組織

主任研究者

根路銘 国昭

国立感染症研究所ウイルス一部呼吸器系ウイルス室 室長

分担研究者

吉川 堯

北里大学獣医畜産学部

教授

富樫武弘

札幌市立札幌病院

理事

稲松孝思

東京都老人医療センター感染症科

部長

鈴木重任

東京都立衛生研究所

所長

杉田繁夫

日本中央競馬会総合研究所

主査

協力研究者

根路銘令子

国立感染症研究所

Stephen Lindstrom

国立感染症研究所

広本靖明

国立感染症研究所

田辺紀子

国立感染症研究所

新庄正宜

国立感染症研究所

斉藤恵子

国立感染症研究所

根岸ふじ江

国立感染症研究所

上野すみ江

国立感染症研究所

関 一洋

北里大学獣医病理学教室

村中雅則

北里大学獣医病理学教室

植木秀彰

北里大学獣医病理学教室

安達佳子

東京都老人医療センター

櫻田政子

東京都老人医療センター

安中めぐみ

東京都老人医療センター

関戸ひとみ

東京都老人医療センター

鈴木里和

東京都老人医療センター

栗山 茂

東京都老人医療センター

吉野正俊

東京都老人医療センター

増田義重

東京都老人医療センター

新開省二

東京都老人総合研究所

渡辺修一郎

東京都老人総合研究所

関根大正

東京都立衛生研究所

平田一郎

東京都立衛生研究所

協力研究者

新開敬行

東京都立衛生研究所

加藤一夫

福島県衛生公害研究所

水口康雄

千葉県衛生研究所

益川邦彦

神奈川県衛生研究所

中村信也

静岡県環境衛生科学研究所

宮崎 豊

愛知県衛生研究所

江部高廣

大阪府立公衆衛生研究所

井上博雄

愛媛県立衛生環境研究所

加藤元博

福岡県保健環境研究所

東郷正美

鹿児島県衛生研究所

目 次

	(頁)
1. パンデミー・間パンデミーインフルエンザのサーベイランスに関する調査研究 総括研究報告書（平成 11 年度） 主任研究者：根路銘国昭（国立感染症研究所呼吸器系ウイルス室 室長）	1
2. インフルエンザ脳炎・脳症に対する抗血清療法の有効性に関する基礎研究 分担研究者：吉川 堯（北里大学獣医畜産学部 教授）	65
3. インフルエンザ流行中に発症した小児急性脳炎・脳症の発症状況に関する研究 分担研究者：富樫武弘（札幌市立札幌病院 理事）	94
4. 高齢者に対するインフルエンザワクチン接種に関する研究 分担研究者：稲松孝思（東京都老人医療センター 部長）	101
5. 各種インフルエンザウイルス株に対する抗体保有調査 分担研究者：鈴木重任（東京都立衛生研究所 所長）	112
6. インフルエンザウイルスの分子進化ソフトの開発 分担研究者：杉田繁夫（日本中央競馬会総合研究所 主査）	163

パンデミー・間 パンデミーインフルエンザのサーベイランスに関する調査研究

(主任) 研究者 根路銘 国昭 国立感染症研究所ウイルス一部呼吸器系ウイルス室室長

研究要旨 地方衛生研究所の10施設に及ぶサーベイランス定点で実施した血清疫学調査は、全年齢層でA・香港型(H3N2)のワクチン株に対し高い抗体分布が確認されたが、A・ソ連型(H1N1)とB型の流行株についての抗体は低く推移していることが示された。また、ブタにおける調査は、H5及びH9ウイルスの浸潤は確認されなかった。一方、ウイルス分離を基礎にした流行ウイルスの疫学的調査は、世界の中で我が国だけでA・ソ連型が主流ウイルスとして1999-2000シーズンで中規模のインフルエンザ危害をもたらし、分離株総数に占めるA・H1N1の割合が60%近くに達していることがこの見解を支持した。二番手のウイルス分離比は、A・H3N2がおおよそ40%、そしてB型ウイルスが僅か6株となっていた。分離ウイルスの抗原構造の解析は、A・ソ連型はワクチン株とA/New Caledonia/20/99様変異株が共存し、A・香港型はワクチン株のA/Sydney/5/97様ウイルスが大勢を占めていることを明らかにした。少数派のB型では、ワクチン株から変異したウイルスも分離された。血球凝集素(HA)遺伝子の進化的解析では、進化的に多様性を示すA・ソ連型のA/New Caledonia/20/99様変異株が新しい進化系統を代表していることが示され、さらにA・香港型ではA/Sydney/5/97株から大きく離れた進化ウイルスが系統樹の先端に位置していることが解った。また、抗原構造の成績とも一致し、B型ウイルスはワクチン株から一段と進化したウイルスが流行していることも明らかとなった。インフルエンザ脳症は、北海道領域における調査で得られた最も重要な知見は、インフルエンザの重症度で最もリスクが高いのはA・H3N2型、次にB型と続き、A・H1N1ウイルスは下気道炎の発生は小さく、特に脳炎発生は皆無であったということである。この地区だけで小児における脳炎・脳症は既に64例に達し、その高い死亡率(43.8%)と後遺症(20.3%)が目撃された。こうした症例から分離されたウイルスの遺伝子解析はA・香港型及びB型ウイルスにおいても、そのHA遺伝子と内部遺伝子に特徴的なアミノ酸置換が認められたことは、今後の脳症の原因解明に新しいヒントをもたらした。脳炎発生のモデルに用いたH5N1ウイルスをマウスで重度の非化膿性髄膜炎と間質性肺炎をおこし、脳炎発生にHAと2つのポリメラーゼ(PB1とPA)、そしてNS1遺伝子の四つのいずれかのアミノ酸置換が関係しているという重要な知見が得られた。同時に脳症発生および肺炎、重病性に、H5N1ウイルスの内部遺伝子が多義的に関与していることが明らかとなった。しかも、脳炎発生に早期の血清療法が有効であるという知見も得られた。また、本研究で、ウイルス進化機構をシミュレーションするソフトも開発された。最後に老人におけるインフルエンザワクチンの効果は、1回でも、2回接種でも有効であることが示されたことの意義は大きい。そして、死亡危害の背景は、超過死亡を基礎にした時、心臓病、脳脈官系の疾患に加え、65才以上の危害の大きさが背景にあることが示され、特に後者の被害は、高齢化が進む社会の中で拡大している傾向が示された。

分担研究者：

吉川 堯	北里大学獣医畜産学部	教授
富樫 武弘	札幌市立札幌病院	理事
稲松 孝思	東京都老人医療センター	部長
鈴木 重任	東京都立衛生研究所	所長
杉田 繁夫	日本中央競馬会総合研究所	主査

A.研究目的

インフルエンザウイルスは、新型ウイルスの出現、その後の冬期を中心にしたインフルエンザシーズンにおける多彩な被害、流行ウイルスの多様な変異機構の発生を特徴としている。これらの被害を食い止める為の治療とワ

ワクチンによる予防は、新しい戦略と技術を導入した。インフルエンザ疾患は、正に多角的な視点からの研究活動の着手が最も求められている重要な課題である。新型ウイルス対策は、まず本格的な流行に入る前にウイルスを先行捕捉し、次のワクチン生産への道のりを短縮することが重要で、その為のサーベイランス活動と、遺伝子再集合がヒトとトリウイルスの間で既に実行されているかを確認することが大切であろう。それを標榜して、抗体分布の調査、流行ウイルスの分離、そして遺伝子分析を実施しなくてはならない。さらに、流行ウイルスの予測の為に実施するヒトの血清学的調査、流行ウイルスの分離と抗原構造の解明は、ワクチンの有効性を高めて、さらなるインフルエンザ対策に生かされることになる。インフルエンザ危害の解明は、重度の肺炎に加え、脳症・脳炎発生の被害調査、超過死亡解明によって初めて可能であり、これらの被害にウイルスの変異がいかに関わっているかを分析する必要もある。こうした問題は、流行ウイルスの変異機構の解明から、脳症・脳炎の発生にウイルスの遺伝子構造がどのように関係しているかを明らかにしていかなければならないであろうし、また、こうしたアプローチなくして被害救済の実効も期待できない。今日まで、ウイルスの流行予測は抗原変異を中心に据えた経験的な手法が採用されてきたが、近未来の予測の在り様は、進化をシミュレーションするシステムの確立と進化学的情報システムも取り入れていかななくてはならない。同様に、脳炎発生をモデル動物で、ウイルス遺伝子構造の支配を明らかにすることは、近未来の脳炎被害の予測にも連動し、さらなる対策にも生かされるであろう。インフルエンザ対策は、抗ウイルス剤等による治療とワクチンによる予防が中心になるが、ワクチンの有効性とその利用法についての十分な情報は今のところ我が国にはない。本研究は、今日のインフルエンザ対策のあり方を、血清情報、ウイルス流行状況の調査、遺伝子構造の解明、ウイルスの進化機構の解明、ウイルスの変異と脳症・脳炎との関係、流行被害の実体並びにイン-

フルエンザワクチンの利用についての情報と知見を総合的研究結果から収集し、より実効ある方法によって確立する為に実施するものである。

B. 研究方法

ヒトとブタにおける血清疫学的調査。

ヒトにおける抗体分布の調査は、0才から60才以上の年齢層から血清を集め、RDE処理後にA/北京/262/95(H1N1)、A/石川/42/98(H1N1)、A/サマラ/234/99(H1N1)、A/シドニー/5/97(H3N2)、A/福島/99/98(H3N2)、A/四川/346/98(H3N2)、B/山東/7/97、B/山梨/166/98 および B/高知/193/98の不活化抗原を用いて血球凝集阻止(HI)試験を、次の10の地方衛生研究所で実施した。

1. 福島県衛生公害研究所
2. 千葉県衛生研究所
3. 神奈川県衛生研究所
4. 静岡県環境衛生科学研究所
5. 愛知県衛生研究所
6. 大阪府公衆衛生研究所
7. 愛媛県立衛生研究所
8. 福岡県保健環境研究所
9. 鹿児島県衛生研究所
10. 東京都立衛生研究所

また、ブタにおける抗体分布の調査は、血清をJensen法で処理し、A/duck/Singapore /3/97 (H5N3)、A/Aichi/2/68(H3N2)、A/NJ/8/76(H1N1)およびA/turkey/Wis/1/66(H9N6)ウイルスの不活化抗原を用いて各衛生研究所においてHI試験で実施した。

ウイルスのサーベイランス。

各定点観測点で集めた臨床材料をMDCK細胞または発育鶏卵内に接種してウイルス分離を実施し、初期のウイルス抗原の同定は、流行期前に国立感染症研究所呼吸器系ウイルス研究室から配布したフェレット感染血清を用いてHI試験で実施した。

遺伝子構造の解明。

抽出したウイルスRNA遺伝子分節をRT-PCRカセットで閉じ込め、RT-PCR-AMV様式2.1Takaraを用いて、9.5ulRNA, 1ul 9-merランダムプライマー(50uM)、これに9.5ulの逆転写酵素混合液 (4ul 25mMMgcl2, 2ul 10xRT-PCR 緩衝液, 2ul 10mMdNTPs, 1ul 逆転写酵素, 0.5ul RNaseインヒビター)を加えて反応系を作った。

これを30Cで10分間次いで42Cで60分、992Cで5分間反応させた。合成されたDNAを遺伝子の全領域をコードするカセットでPCRを実施し、この合成DNAをQIAゲル抽出キットで精製し、PRISMオートシーケンサーで塩基配列を調べた。解明された塩基配列をNeighbour-Joining法で進化系統樹を作成した。系統樹の内部進化エダを信頼性を500 bootstrap replication法で確認した。

インフルエンザ脳炎モデル系を利用した脳炎発症機構の解明。

マウスでA/HongKong/156/97H5N1), A/Hong Kong/483/97(H5N1)およびA/turkey/England/63 (H7N3) ウイルスをddYマウスの鼻腔内に自然感染させて実施した。病態の調査は、肺、肝臓、腎臓および脳内におけるウイルスの定量とELISAによるウイルス抗原の分布、これに死亡率と体重の変化を指標にして実施した。さらに各臓器についての病理学的調査も併せて行った。脳炎のワクチンによる予防と血清療法はマウスで実施し、血清療法にはマウス免疫血清を用いた。

高齢者におけるワクチンの効果についての研究。

この研究は、東京都老人医療センターで実施し、罹患率、重症化率、抗体の上昇および副反応を対象に調べた。

超過死亡率等の調査。

インフルエンザ及び肺炎死、超過死亡、小・中・高校におけるインフルエンザ様患者数、欠席者数、学級閉鎖及び学校閉鎖数をインフルエンザウイルス分離数と比較解析して調べた。超過死亡は次の数式で解析した。

進化ソフトの開発。

ファイルメーカー社のデータベースソフトウエアパッケージのファイルメーカー Pro.ver.4のインターネット上で公開、利用できるデータベース及び計算式をプログラムして行った。

C. 研究成果

1. 流行ウイルスに対する抗体分布。

10県の地方衛生研究所で集めた1664の血清を用いて、1995-1998年に流行してきたウイルスについての年齢別抗体分布の調査を実施した。年齢別の血清数は157から217に達し、多分に

5才間隔で区分して得られる平均抗体価は信頼の高いものと期待される。A・ソ連型について見た場合、感染予防が成立すると思われる40倍以上の抗体水準は、ワクチン株のA/北京、変異株のA/石川に対し、全体的に極めて低いという結果が出てきた。これに対し、1999年にロシアで分離されたA/サマラに対しては19才以下の人達で抗体が高く推移していた。この原因を明らかにする為、A/サマラのHA遺伝子の塩基配列を決定して進化系統樹を構築した。この結果から、1999年に分離されたにも関わらず、A/サマラ株は1980年代の古い系統に属していることが示された。本ウイルスに対する抗体の異常の高さは、ふるい免疫応答を反映したものであることが示された。とはいえ、A/石川及びA/北京に対する抗体の低さは、1999-2000シーズンにA・ソ連型が流行できる背景を作っているものと考えられる。一方、A・香港型のA/シドニーに対する全年齢層における高い抗体水準の推移は、本ウイルスが過去2シーズンにわたって流行してきたという実績を反映したものであろうと想定された。ところが、変異株のA/福島については全年齢層で極めて低く、次のシーズンにこのウイルスが流行する可能性が示唆された。続いて用いたA/四川ウイルスに対する抗体の分布は、A/福島より高かったが、20才以上の年齢層で極端に低くなっていることが明らかになった。また、B型ウイルス□ は、B/山梨およびB/高知に対し、5-19才までの年齢層の人達が30-50%の割合で予防水準の抗体を持っていた。しかし、ワクチン株のB/山東に対しては全年齢層で抗体保有者が少ないという結果が得られた。以上の成績から、A・ソ連型に対する抗体の低さは、同ウイルス変異株が1999-2000年シーズンに流行する可能性を示したものと考えられ、流行ウイルスに対する血清疫学的調査は、今後の流行予測に十分に生かされ、活用できる情報ではないかと考えられる。

2. ヒトインフルエンザウイルスのサーベイランス

1999-2000シーズンのインフルエンザは、1999年の10月下旬に静岡県と岡山県でA・香港型ウイルスが分離されてスタートしたが、同年11月1日から30日の間で、A・香港型に続き

A・ソ連型も分離されるようになったが、この時点における流行の主体は依然としてA・香港型であった。因にウイルス分離の報告があった10県中、唯一宮城県と大阪府だけがA・ソ連型の分離を知らせて来た。つまり、11月下旬までの情報を総合すると、1999-2000シーズンのインフルエンザはやはりA・香港型が中心ではないかと予想された。ところが、12月に入ると予想を覆してA・ソ連型の分離数と分離地域が勢いを増して報告されるようになり、地域的には北海道、東北、関東、近畿、中国、四国そして九州にまで広がっていることが明らかになった。その様子を図1-図4に示したが、日本列島はA・ソ連型が優位に立つ流行となっていることが分かった。その地域的分布の情報と、図5の時間に対するウイルス分離数の推移を重ね合わせて見ると(図5)、明らかにA・ソ連型がA・香港型を凌いで増加していることが観察された。全世界の中で日本だけがA・ソ連型が優勢を占めるインフルエンザシーズンを迎えていることが明らかになった。これと対照的に日本以外でA・香港型が中心となって大きな流行が展開されているという情報が得られた。例えば2000年1月の時点における2653株のウイルス分離中、A・ソ連型が56.2%、A・香港型が43.8%、そしてB型が僅か0.08%であった(図6)。これを参考にすると、我が国ではA・ソ連型とA・香港型が混合流行するという形式を見せながらも、A・ソ連型が主役になるという世界でも例を見ないパターンを示した。

3. 流行ウイルスの抗原分析。

1999-2000シーズンに分離されたA・ソ連型ウイルスの抗原性は、表1に見られるように、A/Miyagi/58/99に代表されるものが、ワクチン株のA/北京/262/95と最新の国際標準株のA/New Caledonia/20/99と高く反応するものが多くを占め、全体の60%近くを占めた(表1)。同様に、A/Sendai/H1544/99に代表されるのA/New Caledonia/20/99と強く反応するものが2番手の流行ウイルスとして確認された。表2に米国、カナダ、韓国で分離された流行株の抗原分析結果を示したが、その全てがA/New Caledonia/20/99様ウイルスであった。表3は、日本で本シーズンに分離されたA・香港型の抗原分析表を示したが、圧倒的にA/シドニー/

5/97株に高く反応するものが多く、その代表株がA/Kitakyushu/697/2000であった。これに対し、A/Shizuoka/38/2000ウイルスは、A/シドニーとは低く、そしてA/Moscow/10/99と高く反応する、つまりA/Moscow様ウイルスであった。来シーズンにこのウイルスがどのような形で出現してつくるのかが注目される。表4に外国のA・香港型ウイルスの抗原構造を示したが、全体的にA/Moscowの血清と強く反応し、同時にA/シドニーとも意外に高く反応していることが明らかになった。ただ、A/MishiganおよびA/Victoriaに代表されるように、A/シドニーとは8倍程度に抗原変異を起こしていることが明らかとなり、こうしたウイルスの次シーズンの到来が危惧された。これらを代表するのが、A/Panama/2007/99である。そして少数派として登場してきたB型ウイルスは、B/Yamanashi/166/98と高く反応するもの、そして国際標準株のいずれとも低く反応するB/Shanghai/180/99株が外国で分離されていた(表5)。そして日本で分離された2株中、1株はB/Yamanashi/166/98に近く、残りの1株はB/Harbin/7/94に近かった(表6)。以上のように、A・ソ連型、A・香港型およびB型ウイルスでワクチン株とはそれぞれ抗原的に変異したものが分離されてきたことは、2000-2001年のシーズンに使用するワクチン株の選定において十分に検討することが要請されているという判断に立たねばならず、今後更なるサーベイランスを強化する必要がある。

4. 流行ウイルスの遺伝学のおよび進化学的分析。

ウイルスの変異を遺伝学的に解析するため、まずA・ソ連型ウイルスHA遺伝子のHA1ドメインの塩基配列を決定し、これをアミノ酸配列に読み換えて比較することにした。結果は、ワクチン株のA/北京/262/95のアミノ酸をベースにして1999年までに分離されてきた流行ウイルスのそれを比較してみると、最近の日本のウイルスは11-12個のアミノ酸置換が見られ抗原分析で見られた変異が遺伝学的にも確認されたことになる(図7-1~7-4)。さらに外国で分離されたウイルスについても比較検討したところ、A/Byerun/07/95、A/North Carolina/2/98あるいはA/Lyon/250/98株に見られる様に、アミノ酸置換はもっと進み、その数

は16程度に及んでいることが示された。今度は、全遺伝子置換の変数を用いて進化系統樹を構築して、変異幅の様子を調べてみた。その結果を図8に示したが、進化枝上でワクチン株のA/北京/262/95は系統樹の底辺に位置し、1998年以降の流行株はそれから大きく離れ、広い範囲に渡って広がっていることが明らかとなった。特に矢印で示したA/New Caledonia/20/99に代表されるように、日本のSendai, Osaka およびChibaは系統樹の最上段に位置し、進化的にはもっと激しい変異を起こしていることが明らかとなった。つまり、1998-1999年に流行したA・ソ連型ウイルスは遺伝学的には多様性を特徴とし、今後さらに変異していくための途上にあるのではないかと想定された。同様の分析をA・香港型についても実施したが、ワクチン株のA/シドニー/5/97を基本として比較してみたところ、1999年のウイルスはHAドメイン領域で16にも及ぶアミノ酸置換が観察された(図9-1~9-4)。図10はA・香港型ウイルスHA遺伝子の進化系統樹を示したものであるが、矢印で示したA/シドニーの進化枝から展開しているそれぞれの流行株のそれは幅広い分化を示し、短い流行期間の中でA・香港型ウイルスがいかに激しく変化しているかを物語っている。特に、矢印で示したA/Moscowの枝から先端の方に伸ばした日本の流行株の位置には注目されるものがある。斜線で強調した日本のHokkaidoおよびShizuokaのウイルス等に見られるように、短い流行期間に北海道から南の沖縄まで駆け抜ける日本の流行像は、世界でも例をみない激しい変異の様子を示しているものとみるべきであろう。

次にB型ウイルスの進化パターンを分析したが、B/Beijing/184/93を基準にした各ウイルスのアミノ酸の変化は進化系統のB/Yamagata/16/88の範疇に入るウイルス群は小さく、B/Victoria/2/87系統では一段と大きくなっていることが示された(図11-1~11-4)。つまり、アミノ酸置換数を基準にした時でも、B/Yamagata系統とB/Victoria系統のウイルスはきれいに区別でき、流行ウイルスの遺伝学解析の重要性を示しているものと考えられる。さらに、前シーズンは日本だけでB/Yamagata系統とB/Victoria系統が同時に流行していることが進化的にきれいに証明されたことの意義は

大きいと言える。こうした傾向は、図に描いて示した系統樹上でもっと鮮明なものとなっており、1987年以来2つの系統に分かれて進化してきたB型ウイルスはさらに大きく分化が進み、今後さらなる変異型が出現する可能性を示唆しているものといえよう。

5. インフルエンザウイルスの違いによる疾患重症化の比較調査

1977年以来世界ではA・ソ連型、A・香港型およびB型ウイルスの3つが引き続いて流行してきたが、これらのウイルスの間で病態の被害程度に差があるか否かを調査してみた。表20にその成績を比較して示したが、1998-1999および1999-2000シーズンにおける全身症状の局所臨床像は、H3N2、H1N1並びにB型ウイルスによってはっきりと差が認められた。例えば、全身症状の一つの指標となる発熱は、39C以下と39.1C以上とで著明な差がありH3N2ウイルスでは39.1-40Cの発熱者はウイルスが分離された患者の34.3-35.6%、および40.1Cの場合は5.17%に達しているのに対し、H1N1ウイルスを同様な比較で見た場合、33.995%と3.68%になっている。そして、B型では両A型ウイルスに比較してその程度は低く、27.24%および1.8%という数字値が算定された。その比較を肺炎の発生等について見た場合、さらに著明な差が浮かび上がり、H3N2では実に2.68%から2.40%に広がっているのに対し、H1N1ウイルスのそれは、0.08%になっている。そしてB型ウイルスではA型両ウイルスの中間の1.531%という結果になっている。このように、インフルエンザの重症度を指標にした高発熱、肺炎そして脳症でみた場合、H3N2、BそしてH1N1という順にそのリスクが高いことが明らかとなり、インフルエンザ対策において占めるプライオリティもこうした臨床像の危険度も配慮すべきであることが示唆された。

6. B型インフルエンザウイルスの特徴的進化機構の解明。

B型インフルエンザウイルスの変異機構はおよそ40年を周期としてdeletionとinsertionのローテーションを基軸にHA分子の安定化を計ること(図13) 加えてNA、MおよびNS遺伝子間の激しい遺伝子交換に特徴づけられていることを我々は既に明らかにしてきた。続いて、1940-1998年に分離された20株のウイル

スの3つのポリメラーゼ (PB2, PB1, PA) 遺伝子の塩基配列を決定し、その進化機構を我々は本研究で明らかにした。分析に用いたウイルス株と塩基配列の登録番号を表7に示した。PB2遺伝子は第1のYAMA88と第2のVIC87の進化系統に大きく区分され (図14)、その傾向はHA遺伝子のそれに極めて類似していた。そして両系統のウイルスはAA66ウイルスと同じ先祖に由来していることも明らかとなった。続いて構築されたPB1遺伝子の系統樹 (図15) は、大勢として第1と第2の進化系統樹に分かれたが、PB2ではYAMA88系統に入っていたSIN79は第2のVIC87の枝の中に動いていることが示された。同じように、同系統に入ってきたNOR84はそれぞれ100%と94%という高い信頼度で分岐していることも分かった。また、一連の分析を通して、PA遺伝子は1994年以前はPB2と同じ進化パターンを見せ (図16)、SIN79とNOR84が第1と第2の系統の初期のウイルスであることが示された。興味ある現象として明らかになったのは、第1のYAMA88系統の中に4株のVIC87様ウイルスが移動したことである。つまり、PA遺伝子の一部はYAMA88とVIC87の系統間で遺伝子交雑を起こしていることが明らかとなった。このように、2つの系統に分化し、さらに両系等が混合するというポリメラーゼ遺伝子の進化がタンパクレベルの変化にどのように反映されているのであろうか。表8にその結果を示した。表からも明らかのように、2313の塩基で合成される769のアミノ酸で作られているPB2タンパクは、第1と第2の進化系統の間で特徴的な変化を見せ、第1の系統のYAMA88様ウイルスのアミノ酸の変化は全体として小さくなっている。例えば、この系統では301と641のアミノ酸の位置が変化しているに過ぎない。ところが、第2の系統に属するPB2タンパクでは115、383、397、468、639と641の場所でアミノ酸置換が認められている。これに対し、PB1タンパクは両系統間で異なった位置で特有な位置でアミノ酸が変化 (第1の系統では、38、57、60および508、第2の系統では178と211) が見られるが、変化のレベルには大きな変化が見られない。アミノ酸全体の長さは752とややPB2よりも小さい。上記両タンパクに対し、PAタンパクにおいては全体として似た領域においてアミノ酸置

換がみられ、PAの726個のアミノ酸の中で唯一462と562の変化が両系統の変異を特徴づけているに過ぎない。

B型インフルエンザウイルスの遺伝子とタンパクレベルにおける進化速度は、A型ウイルスのそれよりも劣るが、ただPBタンパクだけがA型ウイルスのそれよりも速くなっている。例えば、B型ウイルスPB1タンパクは $0.27/\text{site}/\text{year} \times 10^{-3}$ で進化しているのに対し、A型ウイルスのそれは $0.12/\text{site}/\text{year} \times 10^{-3}$ となっている (表9)。表10に進化系統樹を基礎にしたB型ウイルスの遺伝子編成と示したが、1979年以降のインフルエンザウイルス株は、PB2、PB1、PA、NP、M/BM2 およびNS1/NS2遺伝子間で高頻度の遺伝子交雑が起こっていることが初めて解明され、これが1940年以降長期に渡って一つの亜型で流行してきたことの1つの背景になっていることが示唆された。

6. H5N1インフルエンザウイルスの進化の多様性。

1997年5月、香港で3才の男の子から初めてH5N1の新型インフルエンザウイルスが分離され、同年の12月まで30名の患者が発生するという事態が発生した。その中で、6名が多臓器機能不全で死亡、全患者がH5N1ウイルスの侵襲を受けていることが明らかとなった。分離されたウイルスの全てがトリ型インフルエンザウイルスの遺伝子を有し、トリのウイルスは人間に感染しないという通説を覆して全世界を恐怖に巻き込んだ。本研究は、6株のウイルスの総計48本の遺伝子配列を決定し、それを進化学的に解明した。その結果、HAとNA遺伝子は進化学的に2つのグループに分かれ、決して単一ウイルスによる被害でなかったことが示された。さらに、6本の内部遺伝子において、2-3の系統に分かれていることが明らかとなった。表11に分析に用いたウイルス名と遺伝子の種類を示したが、HK156、HK482、HK486、HK483、HK485 およびHK481の6つの遺伝子の相同性は、その類似度において、HK156、HK483あるいはHK481の系統に区分できた (表12)。表の右半分は塩基そして左半分はアミノ酸の類似度を示した。例えば、HK156のPB2、PB1、PA、NP およびNS1遺伝子はHK482とHK486と高い相同性を示し、一方HK483HK485およびHK481

のそれらとは低い値を示した。逆に、HK483の上記4つの遺伝子はHK485あるいはHK481のそれらと比較的高い類似性を示した。表からも明らかのように、HK481のPB2、NP、およびNS1遺伝子はHK156あるいはHK483の系統とは明らかに分かれていることが、その相同性の違いから明らかとなった。表13にアミノ酸置換の場所を要約して示したが、塩基やアミノ酸の相同性の結果を反映して、HK156、HK483あるいはHK481ウイルスの6つのタンパクの変異位置は2つあるいは3つに分かれる系統によって特色づけられた。図17は6つの遺伝子の進化系統樹を示したが、PB2遺伝子はHK156、HK483そしてHK481の系統に分かれた。一方PB2とPA遺伝子はHK156とHK483のグループに分かれたが、両系統のいずれともトリの世界にルーツをもっていることが明らかになったことは極めて興味深い。また、NP遺伝子とNS1遺伝子もHK156、HK483そしてHK481に代表されるウイルスに区分された。しかし、M遺伝子はHK156とHK482の系統に分化し、HK483がHK156ウイルスのM遺伝子に由来していることが明らかとなった。そして6本の全ての遺伝子がトリウイルスのH5N1から直接供給されていることも系統樹の分析は明らかにした。トリのウイルスでありながら何故人間に直接感染出来たかを調べるために、6つの内部タンパクに人間特有のアミノ酸が存在していないかを調べたのが、表14であるが、6つのウイルスのPB2、PA、NPおよびMタンパクの中に人間特有のアミノ酸が埋め込まれていることも本研究は明らかにした(表14)。以上の進化学的解析を基礎に、各ウイルスの8本の遺伝子由来を表15に整理して示した。表からも明らかのように、HK156ウイルスを除く全てのウイルスの遺伝子編成は混合型で、進化系統のiかii、あるいはHK481によって組み合わさっていることが明らかとなった。

7. H7N3およびインフルエンザウイルス脳炎の病理学的解析。

脳炎発生の対照実験に用いたH7N3ウイルスは、マウスの鼻腔内感染によって気管支粘膜の壊死：剥離、気管支周辺に強い細胞浸潤がみられ、その部位に強いウイルス抗原の分布が確認された。マウスは典型的な間欠性肺炎像を見せた。同様に中枢神経系では、延髄疑

核領域にグリア細胞の崩壊がみられ、この部分に強いウイルス抗原の分布が抗体による染色で明らかとなった。しかしながら、マウス尾静脈からの早期の血清療法は、肺炎と脳炎の発生を著明に阻止した。

8. H5N1インフルエンザウイルスの脳炎発症機構の遺伝学的解析。

H5N1ウイルスは、マウスに鼻腔を経ての自然感染によって典型的な全脳炎を誘導できる。本研究は、こうした脳炎の病態にウイルスゲノムがどのように関わっているかを解明するために企画した。不思議なことに、最初に感染し死亡した子供から分離されたHK156ウイルスは、MDCK細胞での継代から発育鶏卵へ変えると急に病原性が低下する。自然経路による鼻腔感染の結果を図19aに示した。MDCK細胞で分離されたこのウイルスを依然として同細胞で増殖した限りにおいては感染後7日目で100%マウスを殺した。ところが、同ウイルスと発育鶏卵で継代してみると、7日目の死亡率は僅か20%、12日目においても60%に留まった。つまり宿主細胞の変化によって病原性が低下したのである。病態の変化を追求するために、今度は直接脳内に両ウイルスを接種してみた。図18bに示したように、MDCKで継代されたウイルスはやはり100%のマウスを殺したが、発育鶏卵由来のウイルスの致死率はいよいよ0%になった。どうも、宿主への継代差による病原性の低下は脳の病原性に関係があるらしいことが浮かび上がってきた。表16は、MDCKと発育鶏卵で増殖させたウイルスに、両ウイルスからブランククローニングされたウイルスの体内分布を示したものである。MDCK由来の親(HK156-CK)とそのクローンウイルスのB1-1-1、B1-1-2およびB3-1-1は2日目から肺でよく増殖し、4日目に入るとついに脳においてもウイルスが検出された。これに対し、発育鶏卵由来の親(HK156-CK)とそのクローンウイルスL7-4-1とD5-7-1は肺ではよく増殖したが、脳では増殖の痕跡が見られなかった。以上のことから、両系統の病原性の差は、脳でウイルスが増殖できるか否かによって決まっていることが強く示唆された。今度は、直接脳炎接種によってその差を調べることにした。ところが、

発育鶏卵由来のウイルスとそのクローンウイルスは、脳内に入ったらそこで増殖できるということが解った(表17)。遺伝子支配の実験に入る前に両系統のウイルスの生物学的性状を調べることにした。MDCK細胞由来のウイルスはニワトリ細胞上で中程度と小さいブランクの両方を形成、ところが発育鶏卵由来のそれは、中程度のブランクしか形成しなかった。どうも、発育鶏卵での増殖で、小さいブランクは捨てられ、中程度のブランクが特異的に選択されたらしいという推理が成り立つ。両系統のウイルスは、MDCKでも発育鶏卵でも増殖し、卵における致死効果でも大きな差は見られなかった。ただ、著明な差はマウスでの致死効果であった。MDCK由来のウイルスは、マウスをよく殺し、発育鶏卵のそれはそうでなかった。その原因は、後者のウイルスは、肺で増殖したあと、脳にウイルスが到達できなかった事にあることがはっきりしてきた。図19のaとbにそのことが著明に示されている。そこで、マウスの脳からクローニングしてきたウイルスにもそのことが示され、発育鶏卵由来のウイルスは、直接接種で脳で増殖できるが、その値はMDCKのそれよりも劣るようであった(図20)。さて、こうした脳炎の病原性の差、脳へウイルスが移行できるか、否かに関わる遺伝子支配はどうなっているのだろうか。表19は、その成績をまとめたものであるが、何と、ウイルスが脳炎を起こすか否かの差は、HAタンパクの211番、PB1の456と712番目、PAの631、NPの127そしてNS1の101番目のアミノ酸が変化したことに関係していることが判明した。それらの全てのアミノ酸かあるいはこの一部が脳病原性に関係しているらしいのである。

9. 小児におけるインフルエンザ脳症の調査。

1994年から1999年にわたって、北海道を定点観測点にして脳症発生の追跡調査を実施した。1994-1995シーズンで12例、1995-1996シーズンで14例、1996-1997シーズンで5例、1997-1998シーズンで22例そして1998-1999シーズンで11例と、5インフルエンザシーズンで総計64例の脳症患者が発生していた。その中で、死亡者が28例(43.8%)、後遺症が13例(20.3%)と極めてリスクの大きい被害であることが明らかとなった。これらの多くの例

で、髄液から遺伝子産物が検出され、インフルエンザウイルスの感染が同疾患の発生と密接に関係していることが示唆された。詳細な病態の分析結果は富樫らの発表を参考にして欲しいが、本研究の中で血管内細胞の障害が脳炎と深く関わっていることを示唆したことの意義は大きいと言えよう。

10. インフルエンザウイルスの分子進化ソフトの開発。

ウイルス進化系統樹と抗原分析の成績を相同させたソフトが作られ、ウイルスの変異に抗原分析の値がいかに表示されているかを明らかにしたことの意義は大きく、地方衛生研究所においても広く利用される可能性が高い。そしてHI抗体の分布と感染の割合がシミュレーションされて示され、同時に抗原決定基のHA分子上を知るソフトが開発され、ウイルスの塩基配列の決定が、HA分子上の三次元の位置における変異の場所が特定されるようになった。また、RNA-PCR計算ソフトの開発は、広い範囲の研究に、PCRのデザインから実際の実験指針にまで立ち入って指導できることが可能となった。

11. 超過死亡を基軸にしたインフルエンザシーズンにおける死亡危害。

日本ではよく知られていないが、インフルエンザが流行する冬期は予想される死亡人口は有意義に高まり、その程度はインフルエンザの流行規模に依存するという。英国やヨーロッパの国々、あるいは米国で観察されているこうした現象はインフルエンザ危害を知る有効な手がかりとして利用され、実際、米国では121の都市に定点観測点を置き、その集計結果は週報として国民に知らせている。が、日本ではこの現象は十分に解明されておらず、為に、インフルエンザ危害に対する国民の認識は浅く、ワクチンを中心に据えたインフルエンザ対策は、先進国の中で最も立ち遅れている。本研究は、そうした好まざる状況を打開するため、わが国におけるインフルエンザ危害を1964-1965シーズンに遡り、1997年までのデータを詳細に解析することにした。図21はインフルエンザシーズンにおける流行規模を知る我が国独特の指標を利用したも

のであるが、小中高校における欠席者数、学級閉鎖あるいはインフルエンザ様患者数の動向はよく一致し、これら3つの冬のシーズンにおける波線は、下段に示したインフルエンザ分離数とよく一致していることが理解できよう。つまり、インフルエンザの発生時期と規模の推移は、小中高校における3つの現象でよく理解できるということになる。次に、病院から報告されてくるインフルエンザ患者数の報告は、さらに同施設において報告されるインフルエンザの原因で死亡した数値とも85%の相関度で有意義に関係していることが分かる(図22)。以上のことから、病院から報告されてくるこれらのデータはインフルエンザの危害分析を実施する上で極めて有用ではないかという見解が示されたことになる。方法で示した公式を利用して分析したインフルエンザと肺炎による超過思慕言を(図23の上段に示したが、多くのインフルエンザシーズンにおいて、様々に突出した死亡人口のあることが確認された。最大のピークは、1984-1985シーズンのアジア(H2N2)型が流行した年に観察された。次に大きいのは、1969-1970年にA/香港(H3N2)型が新型ウイルスとして流行したシーズンで、3番目に同ウイルスが大きく変異した1975-1976年のシーズンである。このように、それぞれのインフルエンザシーズンにおいて、予想を遙かに超える死亡人口の発生が日本で起こっていることが初めて明らかになった。図の下段には、超過死亡の総数を描いたが、この曲線のレベルはインフルエンザと肺炎のパターンときれいに一致し、1969-1970年のシーズンでは、実に54,000人の人々が死亡したという分析結果が示された。図24は死亡人口を基礎にしたリスクのレベルを軽い方の1から最も高い方の10のスコアまでを示したが、インフルエンザと肺炎で算定された値とシーズンの総死亡数は高い相関関係にあることが理解できよう。つまり、インフルエンザの肺炎で死亡した人々あるいはインフルエンザの病気が引き金になった死亡人口は、冬期における総死亡人口に大きく連動していることを強く示唆している。このように、冬期のインフルエンザシーズンは、1シーズンにつき平均12,000人の死亡危害を生み出していることになり、日本の社会に

においてもインフルエンザ対策を国を挙げて実行していかなければならないという現状を浮かび上がらせたということになりはしないか。

12. 高齢者におけるインフルエンザワクチン接種に関する研究。

過重な加齢が加わる老人に対し、インフルエンザがいかに危険か。このリスクを取り払うために使用されるインフルエンザワクチンの安全性と有効性はどうか。そしてやはり2回の接種が必要かどうか。あるいは1回接種でも有効性は確保されるか。といった問題を解決するために本研究を実施した。まず、最初の疑問に、東京都下の離島にある特別養護老人ホームでの流行で解答が得られた。1998年2月から3月にわたって同施設でA/香港型ウイルスが相次いで流行した。同施設を利用する述べ人数51名中3週間で13名(25.4%)が死亡するという事態が発生していた。PCRの診断でA/香港型の遺伝子が検出されたので、多分にインフルエンザ流行による危害であることが示唆された。因に60-69才で9.1%、70-79才で25%、80-89才で16.0%、そして90才以上の高齢者で85.7%の死亡率となっていることから、インフルエンザ疾患が高齢者にいかに高い死亡危害を出しているかが納得できよう。加えて、老人の院内感染も予想以上に高く、こうした高度危険者(ハイリスク)群へのインフルエンザ対策がいかに大切かが如実に示されたことになる。そして、インフルエンザワクチンの老人への接種は1回で予防水準の抗体産生が得られ、2回接種のそれと有意義な差はなかった。ただ、特別養護老人ホームへのワクチン接種は接種率の低い30%前後では有意義な予防効果が得られないことも明らかとなった。そして、50%を超えた時初めてワクチン接種の効果が認められた。以上のことから、施設内へのワクチン接種は、70%以上の接種率があって初めて集団の予防効果が得られると考えられる。このことは、小、中、高校における接種率があった集団で欠席率および欠席日数においても有意義に減少していたという成績とも一致するものであった。

結論

インフルエンザウイルスの血清学およびウイルス学的サーベイランス、進化機構の解析から脳炎発症機構の遺伝学的研究あるいはワクチンの効果についての一連の調査研究から次の知見が得られた。

1. 1999-2000年シーズンの前、つまり1999年4月から8月までに採取した年齢別の抗体分布の調査は、来るべきインフルエンザシーズンの流行ウイルスを予測するのに極めて有効な手法であることが判明した。例えば、A・ソ連型の場合、ワクチン株のA/北京/262/95とこれの更なる変異株のA/石川/42/98に対する免疫水準の低さが、1999-2000年における主流ウイルスがA・ソ連型の流行になることにつながっていることが分かった。また、A・香港型のA/シドニー/5/97に対する成人における抗体分布の不足が、二番手としてA/シドニー株の流行を許容したのではないかと考えられた。

2. ウイルス学的サーベイランスによる分離ウイルス数を根拠にした時、1999-2000シーズンの主流ウイルスは、A・ソ連型のA/北京/262/95様あるいはA/New Caledonia/20/99様株、さらに随伴して流行したウイルスは、A・香港型のA/シドニー/5/97様株であることを明らかにした。

3. 流行ウイルスの免疫学的あるいは進化学的解析。A・ソ連型ウイルスの進化学的解析は、A/北京/262/95から大きく進化し、さらにA/New Caledonia/20/99様変異株が流行していた。また、A・香港型ではA/シドニー/5/97から変異したA/Moscow/10/98様変異株が分離ウイルスの主流を示した。

4. 流行ウイルスの型による重症化の比較調査では、40℃以上の発熱、肺炎及び脳症の発生率でみた場合、A・香港型が最も高く、次いでB型そしてA・ソ連型の順になっていた。

5. B型インフルエンザウイルスの特徴的進化機構の重要な部分が本研究で初めて解明され、HA分子上のdeletionとinsertionの安定したローテーションに加え、3つのポリメラーゼ遺伝子の機能的制約に関連した協調進化並びにNP、M、NS遺伝子間の高頻度の遺伝子再集合によって長期の生存と流行を支えていることが解明された。

6. H5N1インフルエンザウイルスは進化学的に多様性を示すウイルス群が18名の人に感染し、PB2、PB1、PA、NP、MおよびNS遺伝子は2あるいは3つの進化系統に区分され、それぞれのウイルス間で激しい遺伝子交雑を起こしていることが解った。

7. H7N3インフルエンザウイルスの脳炎の病態。H7N3インフルエンザウイルスは、マウスで間質性肺炎を示すだけでなく、鼻腔からの自然感染によって典型的な脳炎像を起こすことが明らかとなった。そして、早期の血清療法はこれを救い、さらにワクチン接種は脳炎発生を完璧に食い止めた。

8. H5N1インフルエンザウイルスによる脳炎発生機構の遺伝子解析。H5N1ウイルスの脳炎の誘導は、HAタンパクの211番、PB1の456と712、PAの631、NPの127あるいはNS1の101番目のアミノ酸の全てか、またその一部の変異によって支配されていることが明らかとなった。

9. 小児におけるインフルエンザ脳症の発生は上昇の傾向を示し、5年間の北海道における調査で、同疾患の死亡率は43.8%、そして後遺症発生率は20.3%であった。

10. インフルエンザウイルス分子進化ソフトの開発。本研究でアミノ酸置換に伴う立体分子機構の変化と抗原変異との関係が簡単に追跡できるソフトが開発され、同時に免疫水準と流行ウイルスのシミュレーションの関係も簡単に追跡できるソフトが作られた。また、PCR診断の実験室で応用できるマニュアルも完成した。

11. 超過死亡被害の調査。我が国における超過死亡の実体像が初めて解明され、1シーズンにつき、およそ12,000名の人々が冬期に死亡していることが明らかとなった。特に、これまでの報告とは異なり、アジアかせ時代の1964-65シーズンにおいても、50,000人以上が死亡していたことの発見は意図深い。そして、超過死亡の原因として最も大きいのはA・香港型、A/アジア型、B型で、A・ソ連型による超過死亡は観察されなかった。

12. 高齢者におけるインフルエンザのリスクとワクチンの調査。特別老人養護施設におけるインフルエンザの流行は極めて危険な高死亡発生率につながり、同施設等へのワクチン

接種は接種率50%あたりから有意な効果が認められた。また、ワクチン接種回数は、一回で十分であるということが、初めて明らかとなった。

Table 1

HI-Japan-v2-3 (3/2+3/16/2000) Antigenic analysis of H1N1 viruses isolated in 1999/2000 season in Japan

Virus antigens Reference strains	HI titers with the following post - infection ferret sera								Date of isolation
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1. CH A/Beijing/262/95	640	40	<10	320	40	160	80	640	02/03/2000
2. GER A/Bayern/07/95	20	640	320	<10	640	10	<10	10	xxxx
3. SA A/Johannesburg/82/96	20	640	640	<10	1280	40	10	40	12/14/99
4. CH A/Harbin/04/97	80	<10	<10	640	80	20	80	320	01/31/2000
5. RU A/Moscow/13/98	20	320	320	20	1280	40	10	10	01/11/2000
6. JP A/Kanagawa/92/98	40	<10	<10	160	<10	320	20	640	12/14/99 other 2 strains
7. JP A/Ishikawa/42/98	40	10	10	320	20	20	640	640	01/24/2000
8. FR A/New Caledonia/20/99	40	20	<10	640	20	80	160	640	01/25/2000
<u>1999/2000 isolates</u>									
<u>A/New Caledonia/20/99- like strains</u>									
9. JP A/Kumamoto/30/2000	20	10	10	160	20	20	160	640	01/27/2000
10. JP A/Kumamoto/46/2000	20	10	10	160	10	20	80	640	
11. JP A/Kyoto/1/99	10	10	10	320	20	80	160	1280	
12. JP A/Nagano/80034/2000	40	20	10	320	40	160	320	1280	
13. JP A/Fukuoka/c-61/2000	40	10	10	160	20	80	160	1280	
14. JP A/Nagasaki/142/99	80	10	<10	40	<10	20	80	160	
15. JP A/Yamagata/173/2000	10	10	<10	80	10	80	80	160	
16. JP A/Yamagata/175/2000	20	10	<10	160	10	80	80	160	
17. JP A/Yamagata/180/2000	10	10	<10	160	10	80	80	160	
<u>A/Miyagi/3/2000- like strains</u>									
18. JP A/Sapporo/174/2000	<10	<10	<10	40	10	20	80	80	02/01/2000
19. JP A/Miyagi/4/2000	10	<10	<10	20	<10	20	40	80	12/21/99
20. JP A/Miyagi/3/2000	10	<10	<10	10	<10	20	20	40	12/21/99
21. JP A/Okinawa/159/2000	<10	<10	<10	<10	<10	160	40	40	01/31/2000
<u>A/Johannesburg/82/96- like strains</u>									
24. JP A/Yokohama/24/2000 E3	<10	1280	640	<10	1280	80	20	80	01/18/2000 other 3 strains
25. JP A/Yokohama/60/2000	20	2560	1280	20	1280	10	<10	80	02/01/2000
26. JP A/Chiba/c389/2000	10	2560	1280	20	1280	10	<10	80	01/28/2000
27. JP A/Chiba/c402/2000	20	2560	2560	10	1280	<10	<10	80	unknown
28. JP A/Kanagawa/56/2000	20	5120	1280	40	2560	10	10	40	01/20/2000
29. JP A/Kanagawa/70/2000	10	2560	2560	<10	5120	<10	<10	40	01/24/2000 other 6 strains

Table 2

Antigenic analysis of H1N1 viruses isolated in 1995 and 1998/1999 season in other countries.

Virus antigens Reference strains	HI titers with the following post - infection ferret sera							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. CH A/Beijing/262/956	640	40	<10	320	40	160	80	640
2. GER A/Bayern/07/95	20	640	320	<10	640	10	<10	10
3. SA A/Johannesburg/82/96	20	640	640	<10	1280	40	10	40
4. CH A/Harbin/04/97	80	<10	<10	640	80	20	80	320
5. RU A/Moscow/13/98	20	320	320	20	1280	40	10	10
6. JP A/Kanagawa/92/98	40	<10	<10	160	<10	320	20	640
7. JP A/Ishikawa/42/98	40	10	10	320	20	20	320	640
8. FR A/New Caledonia/20/99	40	20	<10	640	20	80	160	640
<u>1999/2000 season isolates (CDC)</u>								
9. A/Wisconsin/6/99	80	<10	10	160	10	20	80	320
10. A/Canada/660/99	80	<10	<10	80	<10	40	40	320
11. A/Guanxi/153/99	80	2560	640	40	1280	<10	10	160
<u>1999/2000 season isolates (KOREA)</u>								
12. KO A/Korea/212/99	80	20	≤10	320	20	80	160	640
13. KO A/Korea/239/99	80	20	<10	320	20	40	80	640
14. KO A/Korea/249/99	160	10	20	160	10	80	80	640
15. KO A/Korea/251/99	160	20	<10	640	20	80	160	640
16. KO A/Korea/292/99	80	<10	<10	320	<10	20	40	320
								03/29/99
								04/08/99
								04/12/99
								04/12/99
								04/19/99

Table 3

Antigenic analysis of H3N2 viruses isolated in 1999/2000 season in Japan.										
Virus antigens Reference strains	Hi titers with the following post-infection ferret sera									
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	Date of isolation
1. A/Sydney/05/972	2560	320	80	640	640	640	640	1280	320	06/23/97
2. A/Sichuan/346/98	160	640	80	160	160	160	80	320	80	08/14/98
3. A/Fukushima/99/98	80	320	320	160	160	160	80	1280	1280	02/05/98
4. A/Moscow/10/99	640	80	20	1280	640	640	320	2560	1280	01/15/99
5. A/Shanghai/42/99	160	160	20	160	640	160	40	80	80	03/18/99
6. A/SendaiH/296/99	320	320	80	640	640	640	320	1280	2560	01/16/99
7. A/Panama/2007/99	160	160	20	320	160	320	640	640	640	CDC
8. A/Panama/2007/99 NIB-41	1280	640	320	2560	320	1280	640	2560	1280	NIBSC, UK
9. A/Panama/2007/99 NIB-42	1280	640	160	1280	320	1280	1280	5120	2560	NIBSC, UK
10. A/Panama/2007/99RESVIR-16	320	640	80	1280	320	640	320	2560	1280	FDA, USA
11. A/Panama/2007/99RESVIR-17	1280	1280	320	2560	640	1280	1280	5120	2560	FDA, USA
1999/2000 isolates(Japan)										
A/Sydney/5/97 -like strains :										
12. A/Nara/1/2000	2560	640	320	2560	320	2560	2560	1280	2560	01/08/2000
13. A/Sapporo/36/2000	2560	1280	1280	5120	2560	5120	2560	10240	5120	01/15/2000
14. A/Tama/1417/99	640	320	20	2560	320	1280	320	2560	1280	12/25/99
15. A/Osaka/c26/2000	2560	640	160	10240	320	1280	640	2560	2560	01/15/2000
16. A/Chiba/c342/2000	640	160	80	1280	320	1280	640	1280	640	xxxx
A/Hiroshima/9/2000 -like strains (13 strains) :										
17. A/Saitama/108/99	80	40	40	160	160	80	40	80	320	11/27/99
18. A/Hokkaido/26/2000	40	80	80	1280	320	640	40	320	320	01/18/2000
19. A/Shizuoka/39/2000	20	20	40	640	80	80	40	160	640	01/18/2000
20. A/Hiroshima/8/2000	40	80	80	640	160	160	160	160	320	01/31/2000
21. A/Hiroshima/9/2000	40	40	20	320	80	80	40	160	160	01/31/2000
22. A/Hiroshima/18/2000	10	160	80	640	320	320	160	320	320	01/31/2000
21. A/Fukushima/368/99	40	40	40	640	160	160	160	80	160	12/20/99
22. A/Aichi/97/99	40	80	80	320	160	160	80	160	160	10/29/99
a strain reacted pretty low to all the Reference strains										
23. A/Yamagata/1128/99	10	20	<10	20	<10	10	20	20	20	12/15/99

Table 4

H3-6c-other

Antigenic analysis of H3N2 viruses isolated in 1999/2000 season in other countries.

Hi titers with the following post-infection ferret sera

Virus antigens

Reference strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Date of isolation
1. A/Sydney/05/972	2560	320	80	640	640	640	2560	640	2560	06/23/97
2. A/Sichuan/346/98	160	640	80	160	160	160	160	80	80	08/14/98
3. A/Fukushima/99/98	80	320	320	160	160	160	80	80	80	02/05/98
4. A/Moscow/10/99	640	80	20	1280	640	640	1280	320	1280	03/18/99
6. A/SendaiH/296/99	320	320	80	640	640	640	1280	320	320	01/16/99
7. A/Wakayama/1818/99	1280	640	160	1280	320	1280	2560	640	2560	01/28/99
8. A/Panama/2007/99	160	160	<10	320	160	320	320	640	320	
9. A/Shenzhen/510/99	2560	320	160	5120	1280	2560	2560	1280	2560	
<u>1999/2000 isolates(CDC)</u>										
10. A/Michigan/27/99	160	160	20	640	160	160	320	320	320	
11. A/Victoria/358/99	160	<10	<10	1280	10	320	320	80	160	
12. A/England/653/99	1280	160	40	2560	320	1280	1280	640	1280	
13. A/Alaska/37/99	320	80	20	640	80	320	320	320	320	
14. A/Florida/16/99	320	320	40	1280	320	640	1280	320	640	

Table 5

Antigenic analysis of B virus isolated in 1999/2000 season in other countries.

Virus antigens Reference strains	Reference ferret anti-sera								Date of isolation	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1. CH B/Beijing/243/97	160	160	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Feb. 2, 99
2. CH B/Shangdong/07/97	160	320	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	Mar. 1, 99
3. CH B/Beijing/184/93	<10	20	320	160	80	160	80	160	160	
4. CH B/Harbin/07/94	20	40	320	320	160	160	80	80	80	
5. JA B/Yamanashi/166/98	<10	20	320	320	640	160	80	80	80	
6. JA B/Kouchi/193/99	<10	10	40	40	20	160	80	80	160	
7. JA B/Fukushima/220/99	<10	<10	20	20	10	160	160	160	160	
8. CH B/Shenzhen/654/99	<10	<10	<10	<10	<10	40	20	20	640	
<u>1999/2000 isolate</u>										
9. SA B/Johannesburg/45/99	<10	<10	40	80	320	160	40	40	nt	
10. CH B/Shanghai/180/99	<10	<10	<10	40	80	40	20	20	40	
11. US B/Tennessee/04/99	<10	10	20	40	80	40	20	20	nt	
12. CH B/Jingjun/64/99	<10	10	320	160	640	160	20	20	nt	