

Schedule of workshop

February

26th (Mon)

- 9:30-45 Arrive Murayama-Branch, NIID (Miss Mochizuki)
- 10:00 Move Toyama-headquarter by NIID car (approximately 2 hours travel)
After arrival, registration for ID card (Ms Matsui)
- Lunch
- 13:30 Introduction of NIID
Lecture session of biosafety (Dr Sugiyama)

27th (Tue)

- 10:00 **Opening session** (Dr Odagiri)
Introduction of participants and experts/facilitators
Workshop objectives and schedule
- 10:45 **Discussion session** (NIID experts)
The topics of avian influenza outbreaks in each participant's country
 - introduction of the institute and labs of each participant.
 - the outbreak situation of avian influenza in poultry and human, if any.
 - the responses on diagnosis and surveillance for avian influenza infection, i.e., network of specimen collection, transport from sentinels to national lab and preparation of lab diagnosis system.
 - if possible, the control measures of avian influenza and pandemic preparedness
(15-20 min presentation by participants)
- Lunch
- 13:30 **Lectures** (Dr Odagiri)
 - Overview of influenza and influenza viruses
 - Review of H5N1 highly pathogenic avian influenza and viruses
 - Overview of lab diagnosis system for H5N1 influenza
- 18:00 **Welcome party** (very casual) near Tachikawa Station
(all participants and NIID experts)

28th (Wed)

- 10:00 **Lecture** (schedule may be changed) (Dr Itamura)
 - Quality assurance of lab diagnosis system and set up of diagnosis lab
 - Discussion
- Lunch
- 13:30 **Guidance and start of experiments** (Drs Imai, Kageyama, Ninomiya, Ujike)
 - Virus genome detection by conventional RT-PCR, Real-time RT-PCR etc
 - Discussion

March

1st (Thus)- 2nd (Fri)

• 10:00 **Continue guidance and experiments** (Drs Imai, Kageyama,
Ninomiya, Ujike)

Lunch

• 13:30 **Continue**
• Discussion

5th (Mon) – 9th (Fri)

• 10:00 **Continue guidance and experimants** (Drs Imai, Kageyama,
Ninomiya, Ujike, Obuchi)
• Virus genome detection (continued)
• Virus isolations and detection

Lunch

• 13:30 **Continue**
• Discussion

12th (Mon)

• 10:00 **Biosafety lectures and training for BSL3** (Drs Shinohara, Itamura)

Lunch

• 13:30 **Continue**

13th (Tue)-16th (Fri)

• 10:00 **Continue guidance and experimants** (Drs Imai, Kageyama,
Ninomiya, Ujike, Obuchi)
• Characterizations of isolates by serological and genetic techniques

Lunch

• 13:30 **Continue**
• Discussion

Closing (16th)

List of participants, Instructors and organizers

VietNam

Dr Doan Hai Yen
National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi
E-mail: doanhaiyenlnk@yahoo.com

Myanmar

Dr Poe Poe Linn
National Health Laboratory, Yangon
E mail: yaekhae@myanmar.com.mm

Dr. Khin Khin Mu
National Health Laboratory, Yangon
yaekhae@myanmar.com.mm

Cambodia

Dr Channa MEY
Virology Unit , Institut Pasteur in Cambodia
Email: mchanna@pasteur-kh.org

Instructors of NIID

(Laboratory of Influenza Viruses)

Dr Masaki Imai
Email: maimai@nih.go.jp

Dr Tsutomu Kageyama
Email: tkage@nih.go.jp

Dr Ai Ninomiya
Email: ninomai@nih.go.jp

Dr Makoto Ujike
Email: ujike@nih.go.jp

Dr Masatsugu Obuchi
Email: mobuchi@nih.go.jp
Dr Shigeyuki Itamura
Email: sitamura@nih.go.jp

Dr Takato Odagiri
Email: todayiri@nih.go.jp

(Biosafety Laboratory)
Dr Katsuaki Shinohara
Email: kshinoha@nih.go.jp

Dr Kazuyoshi Sugiyama
Email: ksugi@nih.go.jp

Organizers

Dr Takato Odagiri
Email: todayiri@nih.go.jp

Dr Masato Tashiro
Email: mtashiro@nih.go.jp

(Division of International Cooperation)
Dr Kensuke Nakajima
Email: nkensuke@nih.go.jp

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
（分担）研究報告書

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究
Programme of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010)

（分担）喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座教授

研究要旨： 2006年夏、モンゴルの湖沼で死亡野鳥が再び発見され、死亡したオオハクチョウおよびホオジロガモの臓器材料からH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された。本ウイルスは2005年中国やモンゴルの野生水禽から分離された高病原性のH5N1ウイルスと8つの遺伝子分節すべてが近縁であった。また、これらの分離株の1つA/whooper swan/Mongolia/2/06 (H5N1)をニワトリの静脈内に接種した結果、ニワトリに対して高い病原性を示した。2006年の9月から11月にかけて、北海道およびモンゴルで採集した野生水禽の糞便からウイルス分離を試みた。野生水禽の糞便1,201検体から55株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH2、H3、H4、H6、H9、H10、H11、H13の8つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H5、N6、N8、N9の6つの亜型に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りのうち、133通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザはアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、アフリカ諸国においても発生が報告され、被害が拡大している。現在流行しているH5N1亜型のウイルスによるヒトへの感染・死亡例も報告されており、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。インフルエンザウイルスに感受性がある動物としては、ニワトリ、カモ、七面鳥、馬、豚、ミンクなどが報告されている。また、ヒトを含む哺乳動物および鳥のインフルエンザAウイルスの遺伝子の起源は、カモなどの野生水禽のウイルスであることが今までの研究から明らかにされている。これらのことから、本研究は動物インフルエンザのグローバルサーベイランスを継続して実施し、分離同定されたウイルス株の抗原性、遺伝子性状、病原性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

2006年夏、モンゴルの湖沼で再び多数の野鳥が斃死した。死亡したオオハクチョウおよびホオジロガモの臓器乳剤からウイルス分離を試みた。分離されたウイルスの抗原性および遺伝子解析を行い、近年分離さ

れたH5ウイルス株との相同性を比較した。また、このウイルスをニワトリに接種し、病原性を調べた。

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からウイルス分離をした。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。HAおよびNAの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、これらのウイルス株のHA遺伝子の塩基配列を決定し、HA開裂部位のアミノ酸配列を解析した。

C. 研究結果

オオハクチョウおよびホオジロガモの臓器乳剤からH5N1亜型のインフルエンザAウイルスが合計2株分離された。これらのH5N1亜型ウイルスの遺伝子を解析した結果、2005年中国青海湖やモンゴルの野生水禽から分離されたウイルスと近縁のウイルスであることがわかった。これらの分離株の1つA/whooper swan/Mongolia/2/06 (H5N1)をニワトリの静脈内に接種した結果、高い病原性を示した。

野生水禽の糞便1,201検体から55株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH2、H3、H4、H6、H9、H10、H11、H13の8つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H5、N6、N8、N9の6つの亜型に区分された。

分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りのうち、133通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。

D. 考察

モンゴルの湖沼において斃死した野鳥以外から高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されることはなかった。高病原性鳥インフルエンザウイルスが野生水禽とその営巣湖沼水の間で存続しているかを明らかにするためにも疫学調査の継続が必要である。

E. 結論

動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスは、動物とヒトのインフルエンザ対策に有益な情報とウイルス株を得ることができる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Muramoto Y, Le TQ, Phuong LS, Nguyen T, Nguyen TH, Sakai-Tagawa Y, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y: Pathogenicity of H5N1 influenza A viruses isolated in Vietnam between late 2003 and 2005. *J Vet Med Sci* 68, 735-737, 2006
- (2) Muramoto Y, Le TQ, Phuong LS, Nguyen T, Nguyen TH, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y: Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *J Vet Med Sci*. 68, 527-531, 2006
- (3) Wei HL, Bai GR, Mweene AS, Zhou YC, Cong YL, Pu J, Wang S, Kida H, Liu JH: Rapid detection of avian influenza virus A and subtype H5N1 by single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Virus Genes* 32, 261-267, 2006
- (4) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H: Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol*. 151, 1267-1279, 2006
- (5) Ito H, Ito T, Hikida M, Yashiro J, Otsuka A, Kida H, Otsuki K: Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products. *Dermatology* 212, 115-118, 2006
- (6) Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y: Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol*. 80, 2318-2325, 2006
- (7) Bai GR, Sakoda Y, Mweene AS, Fujii N, Minakawa H, Kida H: Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either influenza A or B virus infections. *J Vet Med Sci*. 68, 35-40, 2006
- (8) Kida H, Sakoda Y: Library of influenza A virus strains for vaccine and diagnostic use against highly pathogenic avian influenza and human pandemics. *Dev Biol (Basel)* 124, 69-72, 2006
- (9) Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y: Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439, 490-492, 2006
- (10) Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sundén Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H: Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol*. 50, 73-81, 2006

2. 学会発表

- (1) 「モンゴルの野生水禽から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および病原性の解析」三成健二、迫田義博、高桑弘樹、磯田典和、高田礼人、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会

(2006年、名古屋)

- (2) 「鳥インフルエンザワクチンの開発 1. H5N1ウイルス不活化ワクチンの免疫効果」磯田典和、迫田義博、曾田公輔、坂部沙織、今村孝、扇谷年昭、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)
- (3) 「A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2)株のニワトリ、アイガモおよびミニブタに対する病原性」迫田義博、津田祥美、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

LAMP 法による Respiratory syncytial virus (RSV) の検出と

分子疫学調査への応用

分担研究者 中山哲夫

北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I 教授

【研究要旨】 Respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A, Bを検出できるLAMP法を開発した。RSVのN蛋白領域に subgroup specific LAMP primer を設定し、RT-PCR 法と感度を比較した。LAMP 法は subgroup A, B 共に 0.1 TCID₅₀ のウイルスゲノムを検出でき交差反応は認めなかった。Bgl II 処理により subgroup A の LAMP 産物はラダーパターンが消失し Subgroup A, B の確認ができた。従来は RT-PCR を行い Bgl II で RFLP を行っていたが、Subgroup A, B specific LAMP 法に確立により RSV の分子疫学調査が簡便化され、LAMP 法を応用し RSV subgroup の流行状況を 1985/86 年から検討し再感染例の調査も行った。1985/86 シーズンから 1999/2000 まで 718 例を解析した。A は 410 例、B は 290 例、RFLP かクローニングにより A+B の重感染例と診断された例は 18 例であった

RSV は、paramyxovirus 属の negative sense RNA virus で subgroup A, B が存在する。乳幼児に感染し細気管支炎をおこし、心疾患、早産児に感染すると重症の下気道感染症に進展し不幸な結果となることを経験する。毎年流行を繰り返すすべての乳幼児は 2 歳までには全例が感染を経験し再感染を繰り返す事で軽症化することが知られている。小児科領域においては重要な呼吸器ウイルスであることが知られているが、老人においてもその重要性が知られてきた。

RSV の診断はウイルス分離、抗原診断、血清学的診断法があるが RSV 迅速診断キットが開発され簡便性から広く普及しているが、老人ではウイルス量が少なくその感度に難点がある。また、subgroup A, B の鑑別は困難で遺伝子レベルの迅速診断キットが望まれていた。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は一定温度で PCR の温度変化を必要としない遺伝子増幅法で遺伝子抽出後 60 分以内に結果を得ることが可能である。RSV subgroup A, B 特異的な LAMP 法を開発し分子疫学調査を行う事を目的とした。

【研究方法】

1) RSV N 蛋白領域に LAMP primer を設定した。Long 株、野生分離株の B 株から RNA を抽出し LAMP 法と RT-PCR 法を比較した。

2) LAMP primer 設定部位の配列には subgroup A, B を鑑別できる Bgl II 制限酵素部位を残し primer 配列に含まれないように設定し、LAMP 産物は Bgl II で処理し確

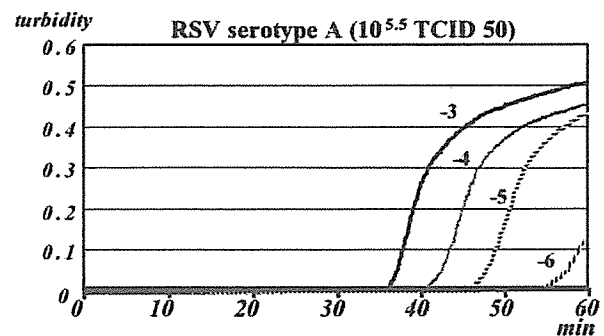
認できるように設定した。

3) 1985/86 シーズンから保存してあった RSV 患児の咽頭拭い液を対象に subgroup A, B の鑑別を RT-PCR RFLP, LAMP 法で分子疫学調査を行った。

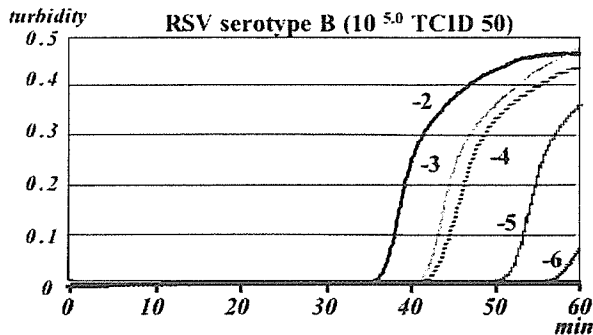
【結論と考案】

1) RSV LAMP 法による RSV 遺伝子の検出

10^{5.5} TCID₅₀/200ul の RSV subgroup A のウイルス液 200 ul より RNA を抽出し 10 倍階段希釈し LAMP 法により検出感度を調べた。比濁度 0.1 以上が陽性で 10⁻⁶ 希釈まで検出可能である。

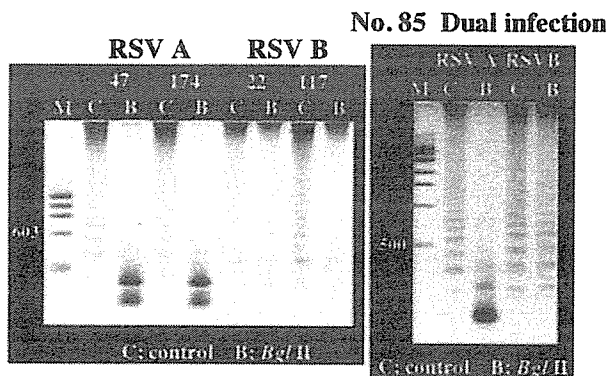


10^{5.0} TCID₅₀/200 ul の RSV subgroup B のウイルス液 200 ul より RNA を抽出し同様に 10 倍階段希釈し LAMP 法を行った。10⁻⁶ 希釈まで検出可能である。



2) RSV subgroup A, B の鑑別

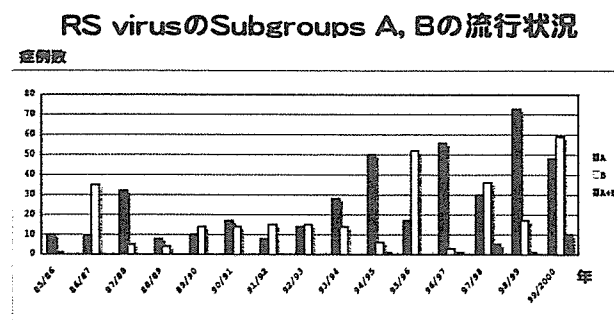
RSV specific LAMP 法で検出された LAMP 産物について遺伝子学的に RSV subgroup A, B の確認を行った。LAMP 産物は ladder pattern をとり A は Bgl I で切断され特徴的な ladder pattern が消失する。サンプル 47, 174 の LAMP 産物は Bgl II で切断されることから RSV subgroup A と診断され、サンプル 22, 117 は ladder pattern が消失せず RSV subgroup B の LAMP 産物には Bgl II 制限酵素配列が存在しないことから subgroup B であることが確認された。サンプル 85 は RSV A, B LAMP 法のいずれでも増幅され RSV A LAMP 産物は Bgl II で切断され、B LAMP 産物は切断されないことから重感染と考えられた。



3) 分子疫学調査

1985/86 シーズンから 1999/2000 までに外来を受診し RSV 感染症が疑われた症例で咽頭拭い液から迅速診断キットで RSV 抗原が検出された症例について RT-PCR, RFLP, RSV LAMP A, B 法で 718 例の subgroup 解析を行った。Subgroup A は 410 例、subgroup B は 290 例、RFLP かクローニングにより A+B の重感染例と診断された例は 18 例であった。1985/86, 87/88, 93/94, 94/95, 96/97, 98/99 シーズンは subgroup A 優位で、1986/87, 95/96 の二シーズンは subgroup B 優位のシーズンで他のシーズンは A と B の混在流行であった。A+B の重感染例は 97/98, 99/2000

年の混在流行の年に観察された。



Subgroup A: 410例、Subgroup B: 290例
A+B: クローニング確定例 9例、RFLP (9例)

4) 再感染例と調査

718 例の RSV 感染症例の中に 66 例の再感染、3回感染例 20 例、4 回感染例 3 例、5回以上は 2 例認めた。同一シーズン内の再感染例は 13 例、1シーズン後の再感染例が最も多く 37 例、2シーズン後は 10 例、3シーズン以上は 6 例であった。半数以上が異なる subgroup の再感染例であったが、同じ subgroup 同士の再感染は 28 例に認められた。

同一シーズン内の再感染のなかには 1-2 ヶ月以内の再感染を認めた。

4回以上感染例のなかには、再々感染例からもウイルス分離される例も認められ、必ずしも再感染、再々感染例で症状が軽くなる傾向はなかった。

RSV subgroup A, B 特異的な LAMP 法を開発し RSV subgroup A, B の流行疫学調査に利用し 2000 年以降の流行状況の解析を続けていく。

【研究論文発表】.

1. Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine* 24: 826-34, 2006.
2. Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* 24: 931-6, 2006.
3. Kamada M, Nagai T, Kumagai T, Igarashi M, Ihara T, Okafuji T, Ochiai H, Sakiyama H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Miyazaki C, Miyata A, Yuri K, Ito Y, Nakayama T, Kase T, Okuno Y. Efficacy of inactivated influenza

vaccine in alleviating the febrile illness of culture-confirmed influenza in children in the 2000-2001 influenza season. *Vaccine* 24: 3618-23, 2006.

- 4 Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 44: 3268-73, 2006.

【学会発表】

1. RS ウイルス再感染例と subgroup A, B の重複感染—15 シーズン(1995-2000)の調査— 第47回日本臨床

ウイルス学会 6/3,4, 2006.東京

2. 早産児に対する早期麻疹ワクチン接種の検討 第47回日本臨床ウイルス学会 6/3,4, 2006.東京
3. SSPE 分離株の転写・複製活性 第47回日本臨床ウイルス学会 6/3,4, 2006.東京
4. 風疹ウイルスの reverse genitics 法の確立 第54回日本ウイルス学会 11/19-21, 2006, 横浜
5. ムンプス再感染・顕性発症例のウイルス学的検討 第38回日本小児感染症学会 11/10-11, 2006, 高知

【知的財産権の出願・登録状況】

特許取得、実用新案登録 なし

その他 なし

ベトナムにおける薬剤耐性遺伝子をもったインフルエンザ菌による小児急性下気道感染症の拡散

分担研究者 渡邊 浩（久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門教授）
研究協力者 渡辺 貴和雄（長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野助手）

研究要旨 2004年7月より2005年4月の間にベトナム、ナチャンにある Khanh Hoa General Hospital に急性下気道感染症のため入院した116例の5歳以下の小児より上咽頭拭い液を採取し、細菌を分離した。72例(62.9%)から病原菌が分離され、インフルエンザ菌は其中で最も多く、39人より分離された。解析可能であった同菌37株は非莢膜保有株であり、22株(59.5%)はβ-ラクタマーゼ産生菌だった。17株がTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子を単独で有し、6株はlow-BLNAR型遺伝子を、6株はTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子とlow-BLNAR型遺伝子の両方を保有していた。6株のlow-BLNAR型遺伝子を持つ菌は5つのPFGEパターンがあり、6株のTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子とlow-BLNAR型遺伝子の両方を保有する菌は4つのPFGEパターンがあった。ベトナムにおいてlow-BLNAR株やTEM-1+low-BLNAR株が広がってきている可能性が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザ菌は市中感染症としての呼吸器感染症、耳鼻咽喉科領域感染症などの主要起炎菌である。本菌にはβ-lactamase産生株、β-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR)株などの薬剤耐性菌が存在し、特にBLNARは近年本邦で増加傾向にあり臨床上問題となっている。本研究ではベトナムで小児急性下気道感染症の原因となっているインフルエンザ菌の薬剤耐性状況を明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

2004年7月より2005年4月の間にベトナム、ナチャンにある病院（Khanh Hoa General Hospital）に急性下気道感染症のため入院した5歳以下の小児の上咽頭拭い液を採取し、細菌を分離した。分離された菌のうち、インフルエンザ菌に対して薬剤感受性試験、β-ラクタマーゼ産生、PCRによる薬剤耐性遺伝子の検出およびパルスフィールド電気泳動（PFGE）を行った。

C. 研究結果

前述の期間に Khanh Hao General Hospital には

急性下気道感染症のために116例が入院し、そのうち72例(62.9%)から病原菌が分離され、インフルエンザ菌は其中で最も多く、39人(2-60ヶ月、平均月齢16ヶ月)より分離され、そのうち検討可能であった37株について解析した。37株のインフルエンザ菌は全て非莢膜保有株であり、22株(59.5%)はβ-ラクタマーゼ産生菌だった。PCRによる耐性遺伝子解析ではBLNAR株は認めなかったが、17株がTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子を単独で有しており、6株はlow-BLNAR型遺伝子を、6株はTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子とlow-BLNAR型遺伝子の両方を保有していた。PFGEによる解析では6株のlow-BLNAR型遺伝子を持つ菌は5つのPFGEパターンがあり、6株のTEM-1型β-ラクタマーゼ遺伝子とlow-BLNAR型遺伝子の両方を保有する菌は4つのPFGEパターンがあった。

D. 結論および考察

薬局で処方箋なしにある程度の抗生物質が購入できるベトナムと日本では、使用される抗生物質の種類や頻度が異なるが、ベトナムにおいては現在BLNAR株の流行はみられないものの、low-BLNAR株やTEM-1+low-BLNAR株が

広がってきている可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, and Oishi K. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. *Tohoku J Exp Med* (in press).
- 2) Iwahashi J, Hamada N, and Watanabe H. Two hydrophobic segments of the RTN1 family determine the ER localization and retention. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355: 508-512, 2007.
- 3) Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, and Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *Epidemiol Infect*, 6: 1-4, 2006.
- 4) Kurita S, Koyama J, Onizuka S, Motomura K, Watanabe H, Watanabe K, Senba M, Apicella MA, Murphy TF, Matsushima K, Nagatake T, and Oishi K. Dynamics of dendritic cell migration and the subsequent induction of protective immunity in the lung after repeated airway challenges by nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein. *Vaccine*, 24: 5896-5903, 2006.
- 5) Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Mizota T, and Oishi K. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F pneumococci in Japan. *Epidemiol Infect*, 2: 1-7, 2006.
- 6) Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada S, Matsumoto K, and Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains

of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*, 11: 429-436, 2006.

- 7) Masaki H, Nagatake T, Asoh N, Yoshimine H, Watanabe K, Watanabe H, Oishi K, Rikitomi N, and Matsumoto K. Significant reduction of nosocomial pneumonia after introduction of disinfection of upper airways using povidone-iodine in geriatric wards. *Dermatology*, 212, suppl 1: 92-96, 2006.
- 8) 渡邊 浩、土橋佳子。抗菌化学療法：診断と治療の進歩。III. 臓器感染症の特性と抗菌化学療法。3. 髄膜炎。日本内科学会雑誌、95:2232-2237, 2006.

2. 学会発表

- 1) 渡邊 浩、宮城 啓。長崎県の旅行会社への旅行医学に関するアンケート調査の解析。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会 合同大会。長崎、2006.10.12.
- 2) 渡邊 浩。薬剤耐性菌による市中呼吸器感染症の現状。第55回日本感染症学会東日本地方会総会・第53回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会教育セミナー。東京、2006.10.27.
- 3) Watanabe H. Symposium, Travel associated infections-Travel clinic in Japan. 10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Fukuoka, Japan, 2006. 12.5.
- 4) Watanabe H, Qin L, Goto K, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT and Oishi K. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant gene isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Osaka, Japan, 2007.1.22.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

「日本における小児呼吸器感染症の現状と耐性菌に対する治療戦略」

分担研究者：黒崎知道 千葉市立海浜病院小児科 診療局長

研究協力者：石和田稔彦 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 講師

研究要旨

日本における小児呼吸器感染症の現状を明らかにする目的で、呼吸器感染症患者から分離された細菌の薬剤感受性ならびに臨床効経過等について検討を行った。その結果、マクロライド耐性 A 群 β 溶連菌、 β ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌、ペニシリン低感受性肺炎球菌の増加が認められた。臨床効経過に関しては、今のところペニシリン系薬剤を中心とした治療で治癒する例が多数を占めるが、今後難治例の増加が予想され、新たな治療方法の検討が必要な状況になりつつある。

A. 研究目的

日本における小児呼吸器感染症の現状を把握し、増加する薬剤耐性菌による難治性呼吸器感染症に対する新たな治療戦略を構築する。

B. 研究方法

- ① 急性咽頭扁桃炎患者から分離された A 群 β 溶連菌 (GAS) の薬剤感受性と治療効果の検討
- ② 急性喉頭蓋炎症例の集積とインフルエンザ菌 b 型 (Hib) 性喉頭蓋炎患者の血清抗莢膜多糖体 (PRP) 抗体価の測定
- ③ 気管支肺感染症患者の洗浄喀痰培養から分離された細菌の薬剤感受性測定
- ④ 気管支肺感染症抗菌薬治療に対する小児呼吸器感染症ガイドラインの評価
- ⑤ 百日咳症例の集積と疫学的解析
- ⑥ 細胞内薬剤耐性インフルエンザ菌に対するマクロライドとペニシリン併用効果の検討

（倫理面への配慮）

各施設の倫理規定に従い行った。

C. 研究結果

- ① GAS のエリスロマイシン耐性率が 10% を越えている。ペニシリン耐性株がないにもかかわらず、ペニシリン系薬剤により除菌不能例が 20% 程度存在す

る。

- ② 小児気管支肺感染症患者由来洗浄喀痰培養有意分離菌の主体は、インフルエンザ菌と肺炎球菌であり、 β ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 (BLNAR) とペニシリン低感受性肺炎球菌の頻度が増加している。
- ③ アンピシリンを主体とした小児呼吸器感染症ガイドラインに沿った治療法により、90%近い症例が治癒するが、治療失敗例の主体は BLNAR である。
- ④ 気道上皮細胞内の BLNAR に対して、ペニシリンとマクロライドを併用すると *in vitro* で相乗効果が認められた。
- ⑤ 急性喉頭蓋炎の主体は Hib であり、急性期の抗 PRP 抗体価は、いずれも 0.15 μ g/ml 未満であり、回復期には抗体価の上昇が認められた。
- ⑥ 千葉県君津郡市で百日咳の小流行が認められ、3 種混合 (DPT) ワクチン接種者でも有症状者を認めた。

D. 考察

小児呼吸器感染症の主要な原因菌の薬剤耐性化が進んでいる。特に BLNAR の増加は著しく、従来の治療法に抵抗する症例も散見される。BLNAR に関しては、気道上皮細胞内に付着、侵入し、抗菌薬の影響をまぬがれることが治療失敗・難治化の原因の一つとして考えられるが、*in vitro* の結果からこのような症例に対して、ペニシリンとマクロライドの併用療法による治療効果が期待される。Hib 性喉頭蓋炎に関しては、Hib ワクチン未導入であった本邦においては、人工呼吸管理を要する重症患者が散見され、急性期の防御抗体価が低値であることより、Hib ワクチンの実用化が望まれる。また、ワクチン既接種者も含めた百日咳流行が認められており、DPT ワクチンの追加接種も検討課題である。

E. 結論

薬剤耐性菌が主体となっている日本の小児呼吸器感染症患者の治療にあたっては、原因菌検索、薬剤感受性モニタリングを継続的に実施することが必要である。また、耐性菌に対する抗菌薬併用療法などの新たな治療法策定、ワクチンによる予防などを積極的に進めていくべきである。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiwada N, Fukasawa C, Inami Y, Hishiki H, Takeda N,

Sugita K , Kohno Y.: Quantitative Measurements of *Haemophilus influenzae* type b Antibodies in Japanese Children. *Pediatr Int* (in press)

- 2) Fukasawa C, Ohkusu K, Sanayama Y, Yasufuku K, Ishiwada N, Ezaki T, Kohno Y: A mixed bacterial infection of a bronchogenic lung cyst diagnosed by PCR. *J Med Microbiol.*55:791-4, 2006
- 3) 荻田純子、黒崎知道、藤崎和仁、牧野 巧、石和田稔彦、河野陽一：最近 10 年間の A 群溶血性連鎖球菌における薬剤感受性、特にマクロライド耐性の年次推移について *感染症学雑誌* 79 : 871-876, 2005
- 4) 深沢千絵, 石和田稔彦, 永井文栄, 荻田純子, 数川久恵, 阿部克昭, 星野直, 会沢治朗, 石川信泰, 黒崎知道, 河野陽一：「小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004」の臨床上的有用性と問題点に関する検討 *日本小児科学会雑誌* 110 : 1256-62, 2006
- 5) 永井文栄, 石和田稔彦, 田島和幸, 河野陽一：千葉県君津郡市で流行した百日咳症例の臨床的検討 *小児感染免疫* 18 : 377-83, 2006

2. 学会発表

- 1) Naruhiko Ishiwada, Chie Fukasawa, Yukiko Inami, Haruka Hishiki, Nobue Takeda, Katsuo Sugita and Yoichi Kohno : Quantitative measurements of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies in Japanese people and in commercially available human immune globulin. 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Infectious Diseases (2006.37~11)
- 2) 菱木はるか, 石和田稔彦, 宮崎修一, 河野陽一, 布谷鉄夫: 薬剤耐性インフルエンザ菌と RSV の混合肺気管支感染マウスに対するペニシリン系薬剤とマクロライド薬併用時の治療効果. 第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20~21)
- 3) 石和田稔彦 寺嶋周, 石川信泰, 上原すゞ子, 金子堅一郎, 久保政勝, 黒木春郎, 黒崎知道, 鈴木宏, 中村明, 原木真名, 永井文栄, 有馬聖永, 荻田純子, 阿部克昭, 深沢千絵, 菱木はるか, 星野直, 武田紳江, 河野陽一: 千葉県における小児インフルエンザ菌・肺炎球

菌全身感染症罹患状況(2003年～2005年). 第55回日本感染症学会東日本地方会(2006.10.27～28)

- 4) 武田紳江, 有馬聖永, 荻田純子, 竹内直子, 牧野巧, 郡美夫, 石和田稔彦, 黒崎知道, 河野陽一最近5年間の洗浄喀痰培養による小児気管支肺感染症の起炎菌の推移. 第55回日本感染症学会東日本地方会(2006.10.27～28)
- 5) 武田紳江, 石和田稔彦, 黒崎知道, 河野陽一小児呼吸器感染症診療ガイドライン2007に向けて肺炎の初期抗菌薬としてのABPCは有用か. 第39回日本小児呼吸器疾患学会総会(2006.11.17～18)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 18 年度分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

アマンタジン耐性 A 型インフルエンザウイルスの流行

分担研究者： 鈴木 宏、齋藤 玲子（新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染医学講座公衆衛生学分野）

共同研究者： 李丹娟、鈴木康司、菖蒲川由郷

研究要旨

1. アマンタジン耐性 A/H3N2

アマンタジンは A 型インフルエンザに有効な抗ウイルス剤で投与後約 1/3 の患者に耐性株が出現する。これまでに市中株中の耐性頻度は 0-3%と低かった。しかし、近年アジアを中心に A/H3N2 株中のアマンタジン耐性ウイルスの増加が報告されている。我々は、日本各地でアマンタジン耐性インフルエンザウイルス調査を行い、2005-06 年シーズンは H3N2 中の耐性インフルエンザ頻度は 65.3%とこれまでにない高頻度であったことが判明した。このウイルスはヘマグルチニン（HA）遺伝子にも特異的な二重変異（193 位、225 位）を持っていた。

A. 研究目的

はじめに

インフルエンザの治療には M2 阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤が有効である。A 型インフルエンザのみに有効な M2 阻害剤としてアマンタジン（シンメトレル®）とリマンタジンがある。本邦ではアマンタジンが 1998 年より A 型インフルエンザに保険適応であるが、リマンタジンは未承認である。アマンタジンは A 型インフルエンザ膜蛋白の水素イオンチャンネルである M2 蛋白を阻害して薬理作用を示す。アマンタジンは安価で安定であるが、投与後、約 1/3 の患者で耐性株が生じ、副作用が多いことが問題である。耐性化はアマンタジンが阻害する M2 蛋白遺伝子膜通過部位の特定のアミノ酸変異(26、27、30、31 位)により生じる。リマンタジンにも相互耐性である。アマンタジン耐性株は自然条件では非常に少ない割合で感受性株に混在し、薬剤の投与による選択圧

で優勢になると考えられる。一般的に、アマンタジン耐性株の人から人への伝播力は感受性株に比べて弱いとされ、これまで高齢者施設や家族などの密に接する集団での伝播感染が報告されるのみで、市中においてアマンタジン耐性株のみの流行は起きていなかった。ヒトの A 型インフルエンザ市中株中の耐性頻度は世界的に 0-10%程度と低かった。

2005 年、Am 耐性をとりまく状況が一変した。2005 年 10 月、米国疾病対策予防センター(CDC)が 2003 年を境にアジアで A 型インフルエンザ香港型(A/H3N2)の Am 耐性株が急増し、中国、香港では 2004 年に 70%前後を占めたと報告した。

日本では、2005 年 9 月、長崎県で起こった季節はずれの A/H3N2 インフルエンザ流行が Am 耐性で生じたことが我々の調査で判明した。米国 CDC は 2005-06 年シーズンに米国内 26 州で採取・分離された A/H3N2 の 209 株中 193 株

(92.3%)が Am 耐性株であるとし、米国では当該シーズンの M2 阻害剤の使用回避が通達された。

我々は、2005-06 年シーズン中、本邦各地で A 型インフルエンザの調査を行い、分離株中のアマンタジン (Am) 耐性頻度とその臨床的特徴、ウイルス遺伝子の特徴を明らかにした。

B. 研究方法

2005 年 11 月から 2006 年 4 月まで、本邦 6 県 (新潟、長崎、宮城、群馬、山形、福岡) の 16 医療施設で調査を行った。インフルエンザ様疾患患者より初診時の咽頭・鼻腔ぬぐい液を採取し、患者の臨床情報を聴取した。MDCK 細胞によりインフルエンザウイルス分離後、株の Am 感受性試験を TCID₅₀/0.2ml 法にて行った。培養株よりウイルス RNA を抽出し、Uni12 を用いて RT 反応を行い cDNA を作成、M2 遺伝子特異プライマーにて膜通過部位を PCR 増幅し、シークエンスにて 26, 27, 30, 31 位のアミノ酸に変異を認められたものを Am 耐性と判定した。併せて分離株の HA 遺伝子、NA 遺伝子解析を行い、遺伝子データベース登録株とあわせ Neighbor-joining 法による系統樹解析を行い、今季流行した Am 耐性株の特徴を解析した。

C. 研究結果および考察

期間中計 750 検体より 415 件の A 型インフルエンザを分離した。354 件 (85.3%) が A/H3N2, 61 件 (14.7%) が A/H1N1 であった。A/H3N2 のうち 231 件 (65.3%) が M2 遺伝子に Ser31Asn(S31N)変異をもつアマンタジン耐性株であった。A/H1N1 に耐性株はなかった (0%)。各地の Am 耐性頻度は、新潟 (101/101)・群馬 (14/14)・山形 (18/18) の H3N2 は 100% Am 耐性株で、宮城 68.2% (15/22)、長崎 42.2% (76/180)、福岡 36.8% (7/19) 様々で優勢度は地域によって異なっていた (表 1)。Am 耐性株が検出された患者には全て Am 投与歴は無かった。耐性株と感受性株では患者の初診時の症状に臨床的な違いはなかった (表 2)。HA 遺伝子解析では、2005-06 年に

流行した Am 耐性株は一つのクレードに集積し (Clade N)、Am 感受性株は別個のクレードを形成した (Clade S) (図 1)。Clade N に属するウイルスは HA 遺伝子に特異的な二重変異 S193F, D225N を認め、Clade S も特徴的なアミノ酸変異を認めた。一方、NA 遺伝子解析では Clade N、Clade S に属する株とも集簇傾向はあったが Bootstrap 値は低く、A/California/7/2004 類似株も含め大きなクレードを形成し、1 シーズン前の株と同一の遺伝子を供するものと考えられた。Clade N の HA のアミノ酸変異 (S193F, D225N) はシアル酸レセプター部位近傍であった。

今回の我々の調査で、2005-06 年シーズンに本邦でアマンタジン耐性 A/H3N2 がこれまでにない大流行をし、流行株の半数以上をしめたことが判明した。地域別には関東以北は耐性株が主流の流行であったが九州二カ所の耐性頻度は低く、感受性株主流で地域により差を生じていた。Am 耐性株はすべての患者で初診時に採取され、アマンタジン内服歴はなく、耐性株の伝播感染によるものと思われた。年齢層も 2 ヶ月児から 106 才までと幅広く、アマンタジン耐性株があらゆる年齢層に伝播罹患していることが判明した。臨床経過については、我々の調査では初診時の症状にアマンタジン耐性株と感受性株に違いは無かったが、薬剤投与の効果と経過については現在解析中である。調査患者の 1 名に海外渡航歴があり、韓国から長崎へ 2005 年 12 月下旬に戻った 1 日後にアマンタジン耐性株に感染しインフルエンザを発症しており、交通機関での感染も含め韓国でもアマンタジン耐性インフルエンザが流行していた可能性が示唆された。本邦では横浜市、奈良県でも高率に耐性株が検出されたとの報告があり、我々の調査と合わせ、2005-06 年シーズンは日本中でこれまでにないアマンタジン耐性株の大流行があったことは確かである。

最近、オーストラリア・メルボルンにある世界保健機関 (WHO) インフルエンザ協力センターが 2005 年にアジア一円でアマンタジン耐性株が

急増したことを報告した。これらはすべて日本、米国と同様に A/H3N2 の耐性株で、頻度はマカオ 100%(10/10)、シンガポール 50%(6/12)、マレーシア 80%(8/10)とアジアでは高かったが、オーストラリアでは 32%(7/22)と比較的低い傾向にあった。ニュージーランドからもこの年に遺伝子データベース上へ耐性株が多数登録されており、アマンタジン耐性株の大流行は世界的な規模でほぼ同時に起こっていると考えられる。ヨーロッパでは 2005-06 年シーズンは B 型と A ソ連型(H1N1)の流行が主流であったためか耐性に関する情報はない。

なぜ、これまで伝播率の低かったアマンタジン耐性株が急に人から人へ高率の伝播感染を起こしたのか、その原因は不明である。我々は 2005-2006 年の S31N-Am 耐性株が、HA に特徴的な二重のアミノ酸変化を持つことを明らかにした。日本の株のみならず、遺伝子データベースに登録された米国とニュージーランドの耐性株、オーストラリアのグループの株も同様の所見がみられる。HA の 193 位と 225 位はシアル酸結合レセプター部位の近傍であるため、同部位の変異により伝播機能変化を生じている可能性がある。同時に解析した NA 遺伝子では、耐性株、感受性株共に A/California/7/2004 と同一のグループに属しており、HA は前年度と比し変化しているものの、NA は同じ遺伝子が継投された可能性を示唆する。

E. 結語

パンデミックにむけて抗インフルエンザ剤の備蓄が進む中、薬剤効果を減弱させる耐性インフルエンザの出現は大きな問題である。この数年間日本の使用量の多さに起因すると思われるオセルタミビル耐性が注目され、さらにこの 1 年はアマンタジン耐性が大きな話題となった。

アマンタジン耐性株、タミフル耐性株とも臨床経過に与える影響についての大規模調査はなされていない。これは欧米での臨床処方量が少なくこれまでデータがなかったことにも起因してい

る。このため、抗インフルエンザ剤の高処方国である日本の臨床研究は注目されている。これまでの薬剤耐性の診断は実験室レベルであり、それが臨床での結果と必ずしも一致していない可能性があり、抗インフルエンザ剤耐性株に対して本当に臨床的に薬剤が無効であるのか今後の多数の症例からの解析が待たれる。

米国ではアマンタジンの使用規制を 2006-07 年まで延長した。果たして 2006-07 年冬もアマンタジン耐性 A/H3N2 株が日本及び世界各地で流行するのか注目される場所である。今後も、既存の抗インフルエンザ剤に対して常に耐性株を迅速に検出して監視し、その情報を臨床にフィードバックし、薬剤選択をする体制を整えていくべきであろう。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito R, Li D, Shimomura C, Masaki H, Le MQ, Nguyen HL, et al. An off-seasonal amantadine-resistant H3N2 influenza outbreak in Japan. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 21-27.
2. Nguyen HL, Saito R, Ngiem HK, Nishikawa M, Shobugawa Y, Nguyen DC, et al. Epidemiology of influenza in Hanoi, Vietnam, from 2001 to 2003. *J Infect* 2007.
3. Otsuka T, Fujinaka H, Kamimura T, Tanaka Y, Hayakawa H, Sato M, et al. Influenza vaccination in severely multiply handicapped persons/children. *Vaccine* 2006; 24: 4096-4101.
4. 齋藤玲子, 李丹娟, 佐藤牧, 鈴木宏. 特集抗ウイルス薬 1.アマンタジン. *Virus Report* 2006; 3: 40-47.
5. 齋藤玲子, 李丹娟, 鈴木康司, 鈴木宏. アマンタジン耐性ウイルスの疫学. *インフルエンザ*

2007; 8: 49-56.

6. 齋藤玲子, 李丹娟, 鈴木康司, 鈴木宏. アマンタジン耐性株の流行. 治療学 2006; 40: 1295-1297.
7. 齋藤玲子, 鈴木宏. 2007. インフルエンザウイルスの耐性化機序 日本臨床 増刊号 新感染症学 (上) 東京: 日本臨床社. 471-475 p.
8. 齋藤玲子, 鈴木宏. 耐性ウイルスの現状と展望. 総合臨床 2006; 55: 2788-2793.

2. 学会発表

1. 齋藤玲子, 李丹娟, 鈴木康司, 佐藤勇, 真崎宏則, 西村秀一, 川島崇, 菖蒲川由郷, 鈴木宏. 2005-06年シーズンの本邦6県におけるアマンタジン耐性A型インフルエンザ頻度. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月19-21日. 名古屋.
2. 鈴木康司, 平良勝也, 李丹娟, 齋藤玲子, 菖蒲川由郷, 鈴木宏. 沖縄での2003-05年の3年間におけるアマンタジン耐性A/H3N2株出現頻度とそれらのM2蛋白, HA遺伝子解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 2006年11月19-21日. 名古屋.
3. Reiko Saito, Le Thi Quynh Mai, Nguyen Tran Hien, Hiroshi Suzuki. Prevalence of amantadine resistance influenza A (H3N2) in six prefectures, Japan, in the 2005-2006 seasons. 11th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim November 16-18, 2006, Singapore
4. Reiko Saito, Hiroshi Suzuki. H3N2 amantadine resistance in Japan. 11th Annual Meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program-Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. January 21-23, 2007. Osaka, Japan.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし