

200804009A

厚生労働科学研究費補助金

社会保障国際協力推進研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 恒雄

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

社会保障国際協力推進研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 恒雄

平成21(2009)年 3月

目 次

I 総括研究報告

- 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
森島 恒雄 1

II 分担研究報告

1. インフルエンザ脳症リスク因子の検討
森島 恒雄 5
2. 本邦におけるオセルタミビル耐性株頻度
齊藤 玲子 7
3. 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
押谷 仁 13
4. ヒトRSウイルス (HRSV) の遺伝子進化
鈴木 宏 17
5. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G タンパクを発現する組換え麻疹ワクチン
AIK-C 株の免疫原性
中山哲夫 22
6. 小児急性呼吸器感染症に関する臨床的、細菌学的研究
石和田稔彦 28
7. 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
河岡 義裕 31
8. 中耳炎の病因微生物と免疫応答の解析
山中 昇 33
9. Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する
抗生物質の抑制効果に関する研究
渡邊 浩 37

10. 臨床検体を用いた百日咳菌タイピング法の迅速化に関する検討 荒川 宣親	40
11. TLR agonist をアジュバントとした PspA 蛋白経鼻粘膜ワクチンの気道に おける菌クリアランス効果 大石 和徳	44
12. Programme of Excellence in Influenza-Phase II (2006-2010) 動物インフルエンザのサーベイランスと感染制御体制の検討 喜田 宏	48
III 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV 研究成果の刊行物・別刷	59
II 分担研究報告	
13. 急性重症肺炎モデルを用いた感染予防に関する病理学的研究 長谷川 秀樹	211

I 総括研究報告

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

研究代表者：岡山大学大学院 森島恒雄

研究要旨：急性呼吸器感染症（ARI）はインフルエンザやRSなどウイルスおよび、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米医学協力研究会のARI部会の活動ともリンクし、東南アジアにおけるARI関連疾患の予防・制御を目的として、多分野の専門家により実施された。①高病原性鳥インフルエンザ/H5N1不活化経鼻ワクチン（Poly I Poly Cをアジュバンドとして用いた）のフェレットに対する有効性を確認した。また、2005年以降中国における新たなH5N1ウイルス（Fujian-like virus）が鳥類で主体となっている原因としてウイルスゲノムのNP分節とM分節の変異が重要であることも示した。②一方、例年発生するインフルエンザについては、タミフル耐性AH1N1インフルエンザの我が国における急速な拡大について、分子疫学の観点から検討し、（1）日本におけるタミフル耐性AH1N1は95%以上となり、（2）またヨーロッパの耐性株と類似することが明らかになった。③またインフルエンザ脳症の予後に関連するリスクファクターについて明らかにした。④RSウイルスの臨床像と遺伝子進化、⑤麻疹ウイルスのフィリピンにおける分子疫学、⑥麻疹生ワクチン株（AIK-C）を用いたRSワクチン作成と有効性の検討などが行われた。⑦呼吸器病原性肺炎球菌やインフルエンザ桿菌の薬剤感受性推移、血清型分布、薬剤耐性株遺伝子変異パターンへの検討に加え、特に⑧TLR agonistをアジュバンドとした肺炎球菌経鼻ワクチン作成の試み、⑨近年、成人を含め流行が定常化している百日咳菌の迅速タイプング法の確立がにおいて興味深い結果を得た。また、⑩中耳炎の病原微生物に対する免疫応答、Nontypeable *Haemophilus influenzae*のバイオフィルムに対する抑制効果に関する研究や⑪小児呼吸器感染症診断における技術的問題点の解析など多く分野で興味深い結果を得た。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症（ARI）についてインフルエンザやRS麻疹ウイルスおよび、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米医学協力研究会のARI部会の活動ともリンクし、東南アジアにおけるARI関連疾患の予防・制御を目的として実施された。

B. C. 研究方法と結果

1) 全国から分離されたウイルスの分子疫学的検討を行いタミフル耐性AH5N1が昨年鳥取県のみ高頻度でだったのが、今年度全国で95%を超えることが明らかにな

った。これは米国を含む全世界的な傾向である。【鈴木、田代、齊藤、河岡】

2) 2006-07年中国において急速に蔓延したFujian-like H5N1の変異がNP分節とM1分節にあることを明らかにした【河岡、】また、鳥ウイルス全体の世界的拡散を調査した。【喜田】

3) インフルエンザ脳症のリスク因子を多変量解析により明らかにした。【森島】

4) 麻疹ウイルスの分子疫学解析および弱毒麻疹ワクチン株（AIK-C）を用いてRSウイルスゲノムを組み込んだ麻疹/RS生ワクチンの動物実験を開始した。【押谷、中山】

- 5) RS ウイルスの遺伝子進化を解析した。
【斉藤、鈴木】
- 5) 小児の中耳炎における感染予防における母乳の役割について検討した【山中】
- 6) Nontypeable *Haemophilus influenzae* バイオフィームについて抗生剤の種類により抑制効果が異なることを示した。【渡邊】
- 7) 小児呼吸器感染症の診断基準についての問題点を明らかにした【石和田】
- 8) 百日咳菌の迅速タイピング法 (multilocus sequence typing 法) を確立した。【荒川】
- 9) TLR agonist をアジュバンドにした PspA 蛋白経鼻粘膜ワクチンを開発し、動物実験で有効性を確認した。【大石】

D. E:考察と結論

上記のごとく多くの分野において興味深い結果が得られた。

F. 健康危険情報

タミフル耐性 AH5N1 の全国的な蔓延について、田代班員、小田切研究協力者、斉藤班員から全国的に報告された。

G. 研究発表 (論文)

Nagao T, et al. Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J*, 27(5):384-9, 2008.

Hassan Zaraket, et al., Molecular evolution of human influenza A viruses in a Local Area During Eight Influenza Epidemics From 2000 to 2007, *Archives of Virology*, 2009 Jan, (Epub ahead of print)

Li D, et al. In vivo and in vitro alterations in influenza A/H3N2 M2 and HA, *J Clin Microbiol*, Feb 2009, (Epub ahead of print)

Han HJ, et al. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. *Vaccine*. 26:1530-4, 2008.

Chemother. 53: 69-74, 2009.

・ Watanabe T, et al. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: the use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 82:2486-2492, 2008.

Katsurahara T, et al. Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). *J Infect Chemother*. 2008;14(6):393-8.

・ Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, Oishi K. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine* 26:4284-4289, 2008

Oshitani H, Kamigaki T, Suzui A. Major issues and challenges of influenza pandemic preparedness in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jun;14(6):875-80.

Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1625-37.

・ Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Iizuka I, Sakai K, Sata T, Kurata T, Kurane I,

Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus

・ Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, Okafuji T, Nakayama T. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Med Virol* 2008.80: 517-523.

・ Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, Nakayama T. Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation. *Vaccine* 2008. 26: 9859-9863.

・ Sakata M, Komase K, Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 2009. 27: 234-242. 121-128, 2008.

Hamada N, et al. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect*, 68: 262-268, 2008.

Watanabe H, et al. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother*, 14: 105-109, 2008.

Ishiwada N, et al. The incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan (2003-2005). *J Infect.* : 57 ; 455-8, 2008

H. 知的財産権の出願など

なし

II 分担研究報告

インフルエンザ脳症リスク因子の検討

主任研究者：森島恒雄（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

研究要旨：インフルエンザ脳症のリスクファクターについて多数の症例について多変量解析を行い、①多変量解析で有意差を認めた尿検査異常（血尿・蛋白尿）、AST(500IU/l \leq)、BS(150mg/dl \leq)、薬剤(ジクロフェナク)使用 ②多変量解析で比較的重要と考えられた高体温、PLT(<10 万/ μ l)、BS(<50mg/dl)、CT 検査異常（浮腫・低吸収域・出血）、薬剤(メフェナム酸)使用③単変量解析でのみだが有意差を認めた下痢、AST(100-500IU/l)、CK(1000IU/l \leq)がインフルエンザ脳症の予後不良因子として重要だと考えられた。これらはインフルエンザ脳症診療上有用なものと考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の重症化に関連するリスク因子について検討した。

B. 研究方法

以下の因子について解析した。

患者背景

年齢、性別、予防接種歴、既往歴（アレルギー・熱性痙攣）、ウイルス型
症状

最高体温、痙攣・異常行動・関節痛・下痢、
初発症状（痙攣・意識障害） 血液検査 PLT・
AST・CK・BS その他の検査

尿検査、CT 使用薬剤 アセトアミノフェン・
ジクロフェナク酸・メフェナム酸

計 22 因子をロジスティック回帰分析（SPSS）
を用い解析した。

C. 研究結果

予後に関わる因子の検討を実施した。

①多変量解析で有意差を認めた尿検査異常（血尿・蛋白尿）、AST(500IU/l \leq)、BS(150mg/dl \leq)、薬剤(ジクロフェナク)使用
②多変量解析で比較的重要と考えられた高体温、PLT(<10 万/ μ l)、BS(<50mg/dl)、CT

検査異常（浮腫・低吸収域・出血）、薬剤(メフェナム酸)使用

③単変量解析でのみだが有意差を認めた下痢、AST(100-500IU/l)、CK(1000IU/l \leq)がインフルエンザ脳症の予後不良因子として重要だと考えられた。

その他、予後不良因子の可能性を指摘されている ALT・LDH・Cr・NH₃・PT は多重共線性の問題や欠損値が多かったことなどから、今回の解析には用いなかった。

D.F. 考案と要約

インフルエンザ脳症のリスク因子について多数の症例で解析した。この結果は、今後の本症の診療上有用と考えられる。

F. 健康危険情報

解熱剤の本症の予後悪化に関する危険性についてはすでに報告し対策がとられた。今回の結果は、それを大規模調査で確認した。

G. 研究発表

Nagao T, Morisima T, Kimura H, Yokota S, Yamashita N, Ichiyama T, Kurihara M, Miyazaki C, Okabe N. Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J*, 27(5):384-9, 2008.

表1 検討因子

患者背景
年齢、性別、予防接種歴、既往歴(アレルギー・熱性痲疹)、ウイルス型
症状
最高体温、痲疹・異常行動・関節痛・下痢、初発症状(痲疹・意識障害)
血液検査
PLT・AST・CK・BS
その他の検査
尿検査、CT
使用薬剤
アセトアミノフェン・ジクロフェナク酸・メフェナム酸
計22因子をロジスティック回帰分析(SPSS)を用い解析した。

表2 単変量解析で有意差を認めた因子1

因子	オッズ比	95%信頼区間	p	
最高体温(°C)	<39	1		
	40-41	3.15	1.06-9.36	0.04
	41≧	11.25	3.34-27.86	<0.001
下痢	無	1		
	有	2.23	1.05-4.72	0.04
血尿・蛋白尿	無	1		
	有	9.65	4.87-19.10	<0.001
CT(浮腫・出血・低吸収域)	無	1		
	有	4.24	2.34-7.70	<0.001

表3 単変量解析で有意差を認めた因子2

因子	オッズ比	95%信頼区間	p	
AST(U/L)	<100	1		
	100-500	2.41	1.40-4.15	0.001
	500≧	9.43	4.99-17.93	<0.001
CK(U/L)	<200	1		
	1000≧	5.77	2.81-11.85	<0.001
PLT(万/μl)	<10	10.79	5.87-19.85	<0.001
	10≧	1		
BS(mg/dl)	<50	11.28	2.23-57.10	0.003
	50-150	1		
	150≧	4.41	2.51-7.76	<0.001
ジクロフェナク	無	1		
	有	3.66	1.77-7.60	0.001
メフェナム酸	無	1		
	有	2.58	1.08-6.14	0.03

表4 多変量解析結果
(有意差を認めた因子)

因子	オッズ比	95%信頼区間	p
血尿・蛋白尿	無	1	
	有	7.96	1.76-35.92
AST(U/L)	<100	1	
	500≧	7.88	1.15-54.00
BS(mg/dl)	50-150	1	
	150≧	4.73	1.10-20.30
ジクロフェナク	無	1	
	有	16.34	1.27-210.18

表5 多変量解析結果
(比較的重要と考えられた因子1)

因子	オッズ比	95%信頼区間	p	
最高体温(°C)	<39	1		
	39-40	11.72	0.31-442.40	0.18
	40-41	15.65	0.42-577.88	0.14
	41≧	42.61	0.98-1851.87	0.05
	PLT(万/μl)	<10	3.79	0.55-26.24
BS(mg/dl)	10≧	1		
	<50	28.79	0.34-2372.98	0.14
50-150	1			

表6 多変量解析結果
(比較的重要と考えられた因子2)

因子	オッズ比	95%信頼区間	p
CT(浮腫・出血・低吸収域)	無	1	
	有	2.59	0.68-9.90
メフェナム酸	無	1	
	有	9.44	0.70-127.73

単変量解析でのみ有意差を認めた因子

1. 下痢症状の有無 (オッズ比: 2.28, p: 0.46)
 2. AST上昇(100-500U/L) (オッズ比: 1.76, p: 0.45)
 3. CK上昇(200-1000U/L) (オッズ比: 1.03, p: 0.97)
- (1000U/L≧) (オッズ比: 1.08, p: 0.94)

本邦におけるオセルタミビル耐性株頻度

研究分担者 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分野・講師

共同研究者： 鈴木康司、Hassan Zaraket、Tatiana Baranovich、Clyde Dapat、Isolde Dapat、小熊妙子、鈴木宏（新潟大学）
西藤岳彦（動物衛生研究所）

研究要旨

2008年、ヨーロッパを中心にオセルタミビル耐性インフルエンザ A/H1N1 株が大流行をおこした。我々は、本邦多施設（北海道、新潟、群馬、京都、兵庫、鳥取、長崎）で採取されたインフルエンザ株をもとに、インフルエンザ H1N1 中のオセルタミビル耐性頻度を調査した。

2007-08年シーズン中は、オセルタミビル耐性株頻度は、H1N1 で 0.4%(3/672 件)と低かったが、2008-09年は 100%(204/204 件)の H1N1 がオセルタミビル耐性であり、薬剤の投与に依存しない耐性インフルエンザ株が大流行を起こしていることが判明した。同時に採取された A/H3N2 は 2 シーズンとも 100%アマンタジン耐性であった。

2007-08年にオセルタミビル耐性 H1N1 が採取された小児患者 1 例では、オセルタミビル投与後の経過が 60-72 時間と延長していたが、他の 2 例の成人例では特に経過の延長はみられなかった。

近年のインフルエンザでは A/H1N1、A/H3N2 共に薬剤耐性ウイルスが大流行を来しており、臨床的な薬剤選択を難しくしている。耐性モニタリングはこれまで以上に重要であると考えられる。

A. 研究目的

抗インフルエンザ剤として M2 阻害剤（アマンタジン）と、ノイラミニダーゼ阻害剤（NA 阻害剤、オセルタミビル、ザナミビル）が、予防・治療に用いられている。これまで、我々は、M2 阻害剤に対する耐性 A 型インフルエンザ株が 2005 年以降世界的に大

流行し、本邦においても A/H1N1、A/H3N2 の 60-100%を耐性株が占めていることを報告した。

2008 年初頭、これまで耐性株の出現が低いとされたオセルタミビル（タミフル®）耐性株がヨーロッパを中心に高い頻度（40-70%）で流行したとの報告があった。

本邦では、国立感染症研究所のサーベイランス検体からの頻度が3%と低いことが報告された。これらの耐性株は、全世界的にNA遺伝子の274位His→Tyrの変異を持っていた。

我々は、独自のネットワークにより、北海道から九州までの本邦の臨床医と協力し、直接インフルエンザ検体を採取し、2007-08年、2008-09年シーズンにおけるインフルエンザ A/H1N1 オセルタミビル耐性株の頻度調査と、オセルタミビル耐性株の患者の臨床経過について検討した。

B. 研究方法

2007-2008年には、本邦6県14医療機関（北海道、新潟、群馬、京都、兵庫、長崎）、2008-09年は、7県19医療機関（北海道、新潟、群馬、京都、兵庫、鳥取、長崎）で調査を行った。インフルエンザ様疾患で受診した患者にインフルエンザ迅速診断キットでスクリーニングを行い、キットでA型又はB型インフルエンザ陽性の検体について、患者の承諾後、ウイルス輸送培地に鼻腔・咽頭ぬぐい液または鼻汁吸引液を採取し、新潟大学に搬送した。同時に、医療機関で、患者情報（性、年齢、ワクチン歴、渡航歴）、治療の種類（オセルタミビル、リレンザ、シンメトレル）と、治療後の簡単な経過について記録した。

搬送後、当教室にて、MDCK細胞によるインフルエンザウイルス分離型別を行い、A/H1N1株について、オセルタミビルとザナミビルに対する薬剤感受性試験（IC₅₀）と（動物衛生研究所にて施行）、NA遺伝子274位のHis→Ty変異について検索した。NA遺伝子変異については、当教室で開発したSNIPsの迅速診断Real Time PCR法であるサイクリングプローブ法と、DNAシーケンスを併用して確認を行った。なお、全ての検体についてアマンタジン耐性検査

（TCID₅₀法とM2遺伝子31位変異Ser→Asn）を行い、M2阻害剤耐性についても検索を行った。

（倫理面への配慮）

本調査においては、検体採取と患者情報聴取に当たって、患者及び保護者に十分な説明を各医療機関で行い、患者の承諾書を取得している。なお、本調査は新潟大学倫理委員会で2008年1月に承諾を受けている。

C. 研究結果

2007-08年シーズンは1022件の鼻腔・咽頭ぬぐい・吸引検体を採取し、755件のインフルエンザを分離した。672件(89.0%)がA/H1N1, 61件(8.1%)がA/H3N2, 22件(2.9%)がB型であった。うち、A/H1N1のオセルタミビル耐性頻度は0.4%(3/672件)、アマンタジン耐性頻度は62.4%(419/672件)であった。A/H3N2は100%(61/61件)アマンタジン耐性であった。

オセルタミビル耐性株は、兵庫で1件(1.1%)、長崎で2件(1.9%)検出された(図1)。検出されたオセルタミビル耐性株3株の、オセルタミビルに対するIC₅₀濃度はそれぞれ901-1253nMと感受性株の300倍以上の阻止濃度上昇が見られた。なお、この株はザナミビルに対しては感受性であった。

NA遺伝子解析では、オセルタミビル耐性株は全てWHO分類の2Bに属し(A/Brisbane/59/2007-like)、さらに兵庫と長崎の1株ずつがそれぞれHawaii系統で、長崎の1株が354位にAsp→Glyの変異をもつ北欧系統(ノルウエー)に属した(図2)。なお、この2Bグループの特徴として、全てがアマンタジン感受性株であり、同時期に流行した別系統の2Cグループは全てアマンタジン耐性株であった。今回のオセル

タミビル耐性株は、全てアマンタジン感受性株の2Bグループに属していた。

タミフル耐性患者の経過については、兵庫の1例(A/Kyoto/07K030/2007)は6才男児で2007年12月17日発症、医院でタミフルを投与され(用量日数不明)、発症60-72時間後に解熱した。なお、同地域でH1N1患者にタミフル投与した際の平均解熱時間は24-36時間であったので、それよりやや延長していると考えられた。長崎でみられた2例目(A/Nagasaki/07N020/2008)、3例目(A/Nagasaki/07N035/2008)は、それぞれ成人例で経過が記録されていなかったが、特に症状の増悪はなく軽快した模様である。12月と1月に採取された、1例目、2例目はHawaii系統で、2月に採取された3例目は北欧系統であった。いずれの患者も受診前に抗インフルエンザ剤は投与されておらず、特に直前の海外渡航歴もなかった。

2008-2009年シーズンについては、現在も調査が進行中であるが、全国的にH1N1優位で、294件のインフルエンザ分離株中、69.4%(204/294件)がA/H1N1、26.9%(79/294件)がA/H3N2、3.7%(11/294件)がB型であった。なお、H1N1の全例がNA遺伝子274位に変異をもつオセルタミビル耐性株であり、今シーズンは本邦で高頻度にオセルタミビル耐性株が流行していることが判明した。H3N2は全てアマンタジン耐性株であった。現在のところ、オセルタミビル、アマンタジンの二重耐性はみられていない。臨床経過については今後検討予定である。

D. 考察

ヨーロッパで2007-08年に高頻度に流行したタミフル耐性株は、我々の調査で、同シーズン中は本邦では頻度が低かった(0.4%)ことが確認された。我々の調査でみつけたタミフル耐性株患者は、タミフル治療以前に耐性を獲得しており、ヨーロ

パでの報告と同様に、タミフル治療とは関連していないことが判明した。

数年前に世界を席卷したアマンタジン耐性株についてはアジア起源で、中国における鳥と人のアマンタジンの濫用が要因の一つと考えられ、さらには、耐性株の伝播・増殖効率を高める遺伝子変異がインフルエンザウイルスに起こったことが判明している。

今回のオセルタミビル耐性株については、オセルタミビルの使用頻度が低いヨーロッパで高頻度に見つかっている。耐性株は、NA遺伝子解析よりHawaii系統と、北欧系統に分かれており、特にHawaii系統は北欧系統とは違い遺伝的にあまり特徴的な遺伝子変異がないため、その起源についてはこれからの研究成果が待たれる。

我々の採取した本邦のタミフル耐性株は、2月にHawaii系統から北欧系統に変わっており、この遺伝子型の変化は、日本の他の報告(感染症研究所、横浜市衛研)と一致している。海外からの新たな遺伝子型の導入がシーズン中にも起こっている可能性が示唆された。

2008-09年シーズンは、H1N1が流行の主流を占め、さらに全てがオセルタミビル耐性と非常に驚くべき状況になっている。NA遺伝子解析からは、北欧系のウイルスであることが判明しているが、大流行の原因となる遺伝子変異を今後追求する必要がある。さらには、同時流行したA/H3N2はアマンタジン耐性であり、臨床医としては、A型の患者に対してザナミビルをファーストチョイスとして使うべきであると考えられた。しかしながら、10才以下の患者ではザナミビルの吸入は難しいため、オセルタミビルかアマンタジンかの選択となるが、全国的にタミフル耐性株が流行の7割を占める流行状況を考えれば、10才以下ではアマンタジンをファーストチョイスとすべきかと考

えられる。しかしながら、我々の調査では地域によってサブタイプ頻度も違うようなので、地域ごとに緊密なモニタリングをする必要があると考えられた。タミフル耐性株患者にタミフルを投与した場合の臨床経過は今後明らかにしていく予定である。

E. 結論

2007-08年シーズンは、オセルタミビル耐性株頻度はH1N1中で0.4%と低かったが、2008-09年は100%のH1N1がオセルタミビル耐性であり、薬剤の投与に依存しない耐性インフルエンザ株が大流行を起こしていることが判明した。

近年のインフルエンザではA/H1N1、A/H3N2共に薬剤耐性ウイルスが大流行を来しており、臨床的な薬剤選択を難しくしている。H5N1でも薬剤耐性ウイルスが増えているという報告もあり、耐性モニタリングはこれまで以上に重要になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li D, Saito R, Suzuki Y, Sato I, Zaraket H, Dapat C, Caperig-Dapat IM, Suzuki H. Changes in the M2 and hemagglutinin genes in influenza A/H3N2 during the development of amantadine resistant strains: comparison between in vivo and in vitro, featuring differences of MDCK-SIAT1 cells and conventional MDCK cells. *J Clin Microbiol*, 2008;47:466-468

2. Zaraket H, Saito R, Sato I, Suzuki Y, Li D, Dapat C, Caperig-Dapat I, Oguma T, Sasaki A, Suzuki H. Molecular evolution of human influenza A viruses in a local area during eight influenza epidemics from 2000 to 2007. *Arch Virol*.

2009;154(2):285-95

3. 齋藤玲子、鈴木宏 インフルエンザの最新知識 Q&A-インフルエンザの診断の進歩は？日本の現状；内科 2009 医薬ジャーナル社 63-64pp

4. 齋藤玲子、鈴木宏 インフルエンザの最新知識 Q&A-抗インフルエンザ薬：アマンタジン耐性の現状もふまえて 2009 医薬ジャーナル社 71-72pp

5. Hassan Zaraket, Reiko Saito, Naohito Tanabe, Kiyosu Taniguchi, Hiroshi Suzuki. Association of early annual peak influenza activity with El Niño southern oscillation in Japan. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2008;2:127-130.

6. Sato M, Saito R, Sato I, Tanabe N, Shobugawa Y, Sasaki A, Li D, Suzuki Y, Sato M, Sakai T, Oguma T, Tsukada H, Gejyo F, Suzuki H. Effectiveness of oseltamivir treatment among children with influenza A or B virus infections during four successive winters in Niigata City, Japan. *Tohoku J Exp Med*. 2008;214:113-120.

7. Saito R, Suzuki Y, Li D, Zaraket H, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Hibi S, Sano Y, Shobugawa Y, Oguma T, Suzuki H. Increased Incidence of Adamantane-Resistant Influenza A(H1N1) and A(H3N2) Viruses During the 2006-2007 Influenza Season in Japan. *J Infect Dis*. 2008;197:630-632.

8. Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Li D, Suzuki Y, Sasaki A, Sato M, Suzuki H. Recurrence and persistence of Fever in children who developed amantadine-resistant influenza viruses after treatment. *Tohoku J Exp Med*. 2008;214:129-138.

9. Li D, Saito R, Le MT, Nguyen HL, Suzuki Y, Shobugawa Y, Dinh DT, Hoang PV, Tran HT, Nghiem HK, Hoang LT, Huynh LP, Nguyen HT, Nishikawa M, Suzuki H. Genetic analysis of influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008;46:399-405.

10. 齋藤玲子他 4 名 インフルエンザと感染防御—施設内での伝播遮断のポイント、感染対策 I C T ジャーナル Vol 3, 2008; 357-361

11. 齋藤玲子、鈴木康司、Hassan Zaraket、鈴木宏 変貌する感染症：インフルエンザ総合臨床 2008；11月号：2639-2644

2. 学会発表

1. Isolde D, Shobugawa Y, Saito R, Suzuki Y, Zaraket H, Clyde D, Suzuki H. Emergence of new genotypes of respiratory syncytial virus from 2001 to 2008 in a community in Japan. US/Japan Cooperative Medical Science Meeting 13th ARI Subcommittee. 2009年2月16-17日 CHIBA.

2. Yasushi Suzuki, Reiko Saito, Hassan Zaraket, Isolde Dapat, Clyde Dapat, Tatiana Baranovich, Hiroshi Suzuki. Circulation of oseltamivir resistance influenza A/H1N1 in Japan. US/Japan Cooperative Medical Science Meeting 13th ARI Subcommittee. 2009年2月16-17日 CHIBA.

3. 鈴木康司、小熊妙子、齋藤玲子、鈴木宏。2007/08 シーズンノイラミニターゼ阻害剤耐性 H274Y 変異 A/H1N1 インフルエンザウイルスの発生。第 22 回東日本外来小児科研究会。2008年10月12日 新潟

4. 鈴木康司、齋藤玲子、西藤岳彦、内田裕子、佐藤勇、日比成美、生嶋聡、藤原史博、橋田哲夫、白髭豊、真崎宏則、星野和彦、

葛蒲川由郷、小熊妙子、Zaraket Hassan、山口正治、Dapat Clyde、Dapat Isolde、川上千春、鈴木宏。本邦 6 地域における 2007/08 シーズンのノイラミニターゼ阻害剤耐性 H274Y 変異 A/H1N1 インフルエンザウイルスの発生。第 56 回日本ウイルス学会 2008年10月26-28日 岡山。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきこと無し

図1 2007-08年シーズン中の本邦に於けるオセルタミビル耐性H1N1頻度

Prevalence of oseltamivir resistance A/H1N1

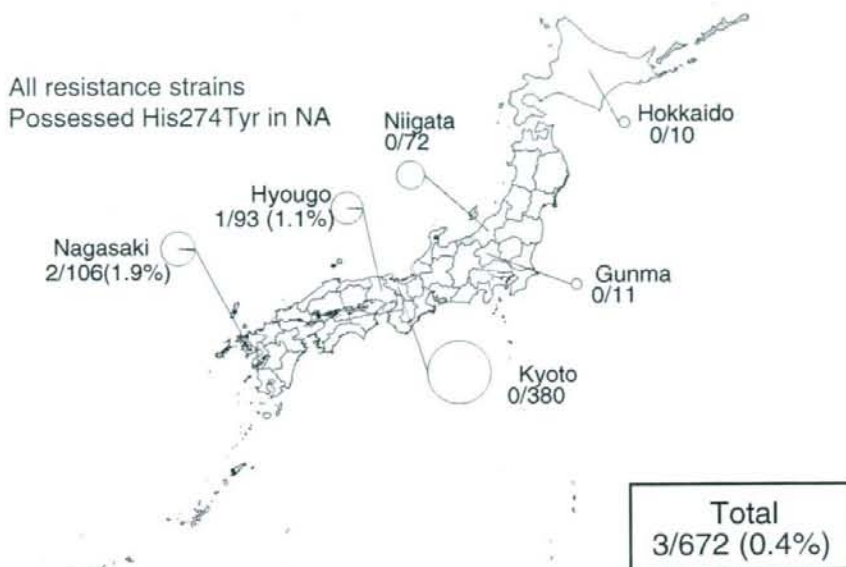
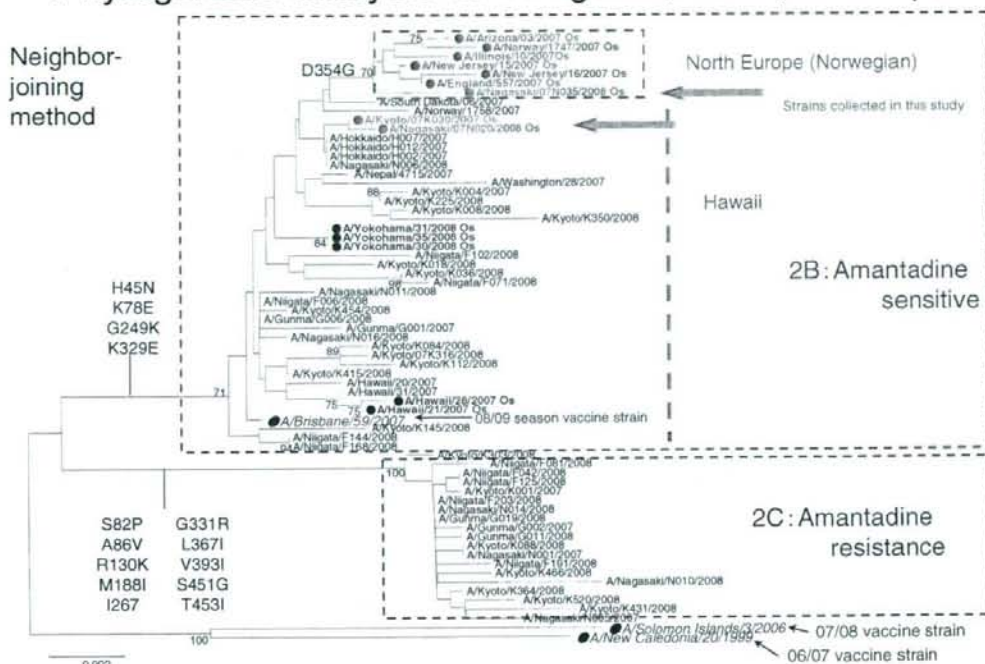


図2 オセルタミビル耐性H1N1株のNA遺伝子樹形図解析

Phylogenetic analysis for NA gene (H1N1, 1372bp)



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」

分担研究者 押谷 仁 東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授

共同研究者:鈴木陽、藤直子

「Reemergence of Measles caused by different genotypes after the mass vaccination in the Philippines.

(フィリピンにおけるワクチンキャンペーン後の新しい麻疹ウイルス株の流行)」

研究要旨

2000年から2008年の間にフィリピン熱帯医学研究所に麻疹サーベイランスとした集められた血清より、麻疹ウイルスをPCRにて検出し、過去に流行した株の同定を行った。2000年から2004年までは、PCR陽性であった検体すべてがD3リニアージであったが、2007および2008年に検出された株は、D9およびG3リニアージに分類され輸入麻疹が示唆された。麻疹のコントロールにおける継続的なワクチン接種の重要性を示す事となった。

A.背景

麻疹はワクチンにて予防可能であるにもかかわらず、以前多くの国々で流行している。フィリピン保健省は、1998年より麻疹対策としてマスワクチンキャンペーンおよび麻疹サーベイランスを行っている。マスワクチンキャンペーンは1998年、2004年、2007年の3回行われた。2004年のワクチンキャンペーン以降、麻疹発生数の減少が見られたが2007年以降再び増加に転じており、これは輸入麻疹による増加であることをH19年度に報告

した。本年度は2007年のワクチンキャンペーン後の発生状況を踏まえ、流行麻疹株の解析を引き続き行った。

B.方法

麻疹サーベイランスとして採取され、マイナス80°Cに保存されていたIgM陽性患者血清より、ウイルスRNAを抽出し、nested PCRにて麻疹ウイルスHおよびN遺伝子を検出した^{1,2}。陽性であった検体について、ウイルス遺伝子塩基配列の同定を行った。

表 1. 麻疹 IgM 陽性検体数および PCR 対象検体数

Year	麻疹 IgM 陽性検体	PCR 対象検体数
2000	2193	35
2001	2143	35
2002	2124	35
2003	1081	35
2004	155	35
2005	0	Not tested
2006	3	3
2007	174	64
2008*	167	122
Total	8040	409

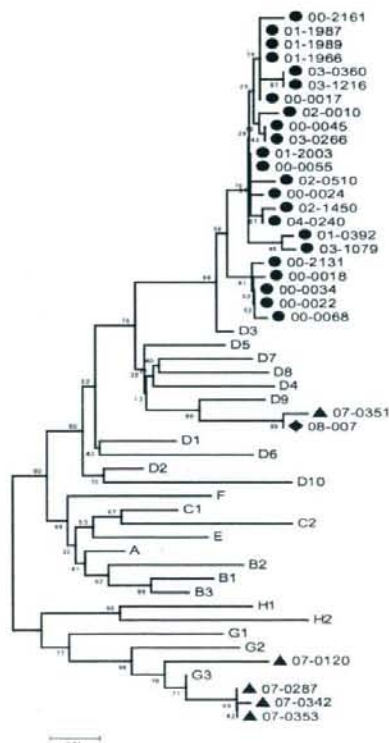
*2008 年は 7 月 25 日までのサンプル

結果

2000 年から 2008 年 7 月 25 日まで、合計 10,395 検体が麻疹サーベイランスとして RITM に提出された(表 1)。2003 年に検体数が半減したが、これは定点医療施設から一部外れたためである。2004 年より陽性検体数が激減していたが、2006 年より増加に転じ、2007 年には IgM 陽性検体が 158 件となった。2007 年 11 月に 3 回目のワクチンキャンペーンが行われたが、2008 年 7 月末時点で 2007 年陽性サンプル数の合計にほぼ達しており、さらなる増加が見込まれた。本研究では、2000 年から 2004 年までは年間 35 例を無作為抽出し、2006 年は全 4 例、2007

年は流行した地域ごと合計 64 検体、2008 年は RNA が抽出可能である検体すべて、合計 409 検体の保存血清より麻疹ウイルスの検出を試みた。H 遺伝子では 58 検体、N 遺伝子では 30 検体が陽性となり、それらの PCR 産物の塩基配列を同定し、WHO のレファレンス株と比較した。(図 1)2000 年から 2004 年までに採取された検体すべてにおいて、麻疹ウイルスは D3 リニアージに分類された。一方、2007 および 2008 年に採取された検体は、D9 および G3 に分類された。2007 年にどのグループにも属さないウイルス株 "07-0120" があった。TA

図 1. Phylogenetic tree of measles in the Philippines based on C-terminus of the N genes. ●2000-2006, ▲2007, ◆2008



cloning による H 遺伝子全塩基配列同定を試みたが、保存検体からは不可能であった。

考察

フィリピン保健省は、2007 年度の Field Health Service System Annual Report(1999-2007)において、過去の麻疹マスクワクチンキャンペーンの評価を行っている。それによると、ワクチン対象年齢層(0 から 4 歳)において、麻疹の発生数が減少している事がわかる(表 2)。さらに、ワクチン対象外の年齢層(5 から 49 歳)においても発生数が減少しており、ハイリスク群へのワクチン接種が全年齢層に影響をあたえていることが明らかになった。2007 年にワクチンキャンペーンを行ったにもかかわらず、2008 年に再度患者が増加している。現時点において、フィリピン保健省より 2007 年度のワクチン接種率の正式な発表が無いため、以前までのキャンペーンとの比較はできない。今後は、定期的なワクチンキャンペーンの実施と同時に、定期ワクチンの更なる普及が集団免疫を維持するのに有用であると考えられる。

2000 年から 2004 年まで D3 が流行していたが、2007 年より D9 および G3 が検出されていたことは、H19 年度に報告した。2008 年においても、引き続き D9 および G3 が流行していた。この流行は、集団免疫獲得まで続くと考えられ、新たな

ワクチンキャンペーンの施行等、早急な対策が必要である。また、輸入麻疹を防ぐため、海外からの麻疹の持ち込みを監視するサーベイランスも考慮するべきである。

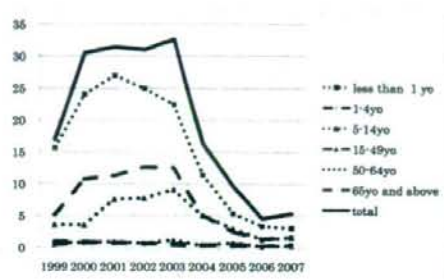


図 2. フィリピンにおける人口 1,000,000 あたりの麻疹発生率

遺伝子型の同定が不可能な検体が存在した。しかし、保存血清からの検出感度が低いため^{4,5)}、遺伝子の増幅が非常に困難であり、大腸菌を使用した TA cloning でも塩基配列の同定が不可能であった。ウイルスの詳細な解析にはウイルス分離を行う必要であり、咽頭拭い液の採取が必須である。試験的に麻疹患者からの咽頭拭い液を採取し、ウイルス分離を試みたが、すべて陰性であった。それらの検体が室温で数日間かけて輸送されたため、ウイルス失活した可能性も考えられる。今後は、検体輸送も含め、検査サーベイランスの強化が望まれる。

参考文献

1. Hiroyuki Saito, et al. Molecular and Cellular Probes. 1995;9: 1-8
2. Makoto Takeda, et al. Virology. 1999;256: