

ーズン後半からは、中国においてもクレード 2C に入る株は減少し、オセルタミビル耐性のクレード 2B 株が急激に増加する傾向が見られ、今冬は中国でもオセルタミビル耐性株が主流になることが予想された。

2-2) A/H3N2 ウイルス :

遺伝子系統樹解析 :

国内では 2524 株の A/H3 亜型ウイルスが分離された。今シーズンの本亜型による流行は、第 3-6 週の季節性インフルエンザ流行時期と、新型 A/H1N1pdm ウイルスとの同時流行期の第 20-23 週にピークをもつ二峰性であった。感染研では国内外から収集した 203 株について、8-10 種類のフェレット参照抗血清を用いて抗原性解析を行った(表 1)。

シーズン前半では、解析した分離株の 72%がワクチン株 A/Brisbane/10/2007 または A/Uruguay/716/2007 類似株で占められていた。一方、シーズン後半になると、ワクチン類似株は急速に減少し、一方では、HI 試験で A/Brisbane/10/2007 に対する反応性が 8 倍以上減少した変異株が出現し、これが分離株の 75%を占めるようになった。これら変異株群は A/Perth/16/2009、A/Hong Kong/1985/2009 および A/新潟/403/2009 フェレット抗血清とよく反応し、抗原的に A/Brisbane/10/2007 類似株群とは明らかに区別された(表 1)。すなわち、本亜型の最初のピークは A/Brisbane/10/2007 類似株で、第 2 ピークは A/Perth/16/2009 類似株で起こった流行であった。

諸外国でもシーズン後半には A/Perth/16/2009 類似の変異株が急増し、南北アメリカ分離株の 41%、オーストラリアを中心とした南半球分離株の 74%およびヨーロッパ地域分離株の 31%は変異株であり、世界的に A/Brisbane/10/2007 類似株から A/Perth/16/2009 類似株へと流行株の主流が移行していく傾向がみられた。

ここ 1-2 シーズンの A/H3N2 分離株においては、赤血球凝集素(HA)蛋白上のレセプター結合部位の変化が生じて七面鳥赤血球を凝集しないもの

が急増している。ヨーロッパ諸国の分離株は特に顕著で、多くはモルモット赤血球のみを凝集した。アメリカおよび南半球からも同様の報告がある。国内分離株も現時点では少数ではあるがモルモット赤血球のみを凝集し、七面鳥赤血球では HI 試験ができない傾向が見られている。従って、感染研では、2009/10 シーズンの A/H3N2 分離株の HI 試験は、1%モルモット赤血球を用いて実施することとした。

遺伝子系統樹解析 :

HA 遺伝子系統樹では K173N のアミノ酸置換を持つクレード 1 と、K173Q のアミノ酸置換を持つクレード 2 に分類された(図 2)。シーズン全体を通じて国内外の分離株はすべてクレード 2 に属しており、これらはさらに A/新潟/403/2009 や A/Perth/16/2009 で代表される E62K, N144K, K158N, N189K 置換を持つグループ A、A/京都/30/2009 や A/Singapore/37/2009 が入り I260M, R261Q 置換を持つグループ B および A/Victoria/208/2009 およびミャンマー株が入り K158N, N189K, T212A 置換を持つグループ C に大別された(図 2)。また、L157S 置換を持つグループ D も識別されたが、5 月以降はこのグループのウイルスは分離されなかった。これら A、B、C グループに属する分離株の全ては抗原的には、ワクチン株 A/Brisbane/10/2007 とは大きく異なっており、いずれも A/Perth/16/2009 類似株であったが、各遺伝的グループ間では抗原性に差はなかった。

2-3) B 型ウイルス :

B 型インフルエンザウイルスには、B/Yamagata (山形) /16/88 に代表される山形系統と B/Victoria/2/87 に代表される Victoria 系統がある。2008/09 シーズンの国内分離株は 2024 株で、内訳は山形系統 25%、Victoria 系統 75%であり、後者が優位を占める両系統の混合流行であった。海外諸国においても B 型の流行株の 90%は Victoria 系統であった。これら分離株については

9種類のフェレット参照抗血清を用いて抗原性解析が行われた。

抗原性解析：

B型の中で主流を占めたVictoria系統分離株は、シーズン前半から本系統のワクチン株 B/Malaysia/2506/2004 からは抗原性が大きく変化しており、解析した分離株のほぼ全てが HI 試験で B/Malaysia/2506/2004 から 8 倍以上減少した変異株であった。諸外国でも同様の傾向が見られたことから、2009/10 北半球シーズン向けのワクチン株は、変異株の代表である B/Brisbane/60/2008 類似株に変更された（ワクチン株の項参照）。

感染研で作製した孵化鶏卵馴化

B/Brisbane/60/2008 株に対するフェレット抗血清は、MDCK 細胞分離株と殆ど反応しない。これは、すでに報告したように鶏卵への馴化によって糖鎖結合部位(197-199)に変異が入り、これによって糖鎖が欠失して抗原性が変化するためである。このため、感染研では、ワクチン株

B/Brisbane/60/2008 類似株に属し、MDCK 細胞で分離された B/堺/43/2008 株に対する抗血清を作製して、これに対する反応性を基準にして、ワクチン株との抗原性の違いを評価した。その結果、シーズン後半には、ワクチン類似株が 67%、8 倍以上反応性が減少した変異株が 23%という比率であった。変異株の大半は、中国分離株が占め、これらは HA 遺伝子系統樹上でも流行の主流とは異なる一群を形成していた。一方、中国以外の諸外国では、南北アメリカでは 71-87%、南半球では 56%がそれぞれ B/Brisbane/60/2008 類似株であった。

一方、少数ながら国内で分離された山形系統株については、前シーズンのワクチン株 B/Florida/4/2006 抗血清とは殆ど反応せず、その類似株で HA 遺伝子グループの異なる B/Bangladesh/3333/2007 抗血清とよく反応した。諸外国で分離され

た山形系統株の大半は、依然

B/Florida/4/2006 類似株であった。

遺伝子系統樹解析：

Victoria 系統の系統樹解析（図 3）では、シーズンを通じて流行株の大半は N75K, N165K, S172P 置換をもち B/Brisbane/60/2008 および B/堺/43/2008 で代表されるクレード 1 に属していた。また、B/Brisbane/60/2008 とは抗原性の異なる多くの中国分離株は、B/Hubei-Xiling/37/2009 で代表されるクレード 4 を形成していた。さらに、国内分離の一部の変異株は B/岩手/17/2009 で代表されるクレード 5 を形成していた。

一方、山形系統株の系統樹は、

B/Florida/4/2006 で代表されるクレード 1、B/Brisbane/3/2007 で代表されるクレード 2、B/Bangladesh/3333/2007 で代表されるクレード 3 に大別されるが（図 4）、国内外の流行株の大半はクレード 3 に属していた。これは前シーズンと全く変わっていなかった。

2-4) 新型 A/H1N1pdm ウイルス：

抗原性解析：

国内では 5 月から流行が始まった新型 A/H1N1pdm ウイルスは、36 週までに 4440 株が分離され、23 週以降は分離株の 98%を占めた。国内分離株の 137 株について、国内初の分離株 A/成田/1/2009（孵化鶏卵および MDCK 細胞で分離ウイルス）、米国 CDC から供与されたワクチン株 A/California/7/2009、それぞれのウイルスに対するフェレット抗血清および七面鳥血球を用いて HI 試験を実施した。また、季節性 A/H1N1 ウイルスとの抗原性を比較するために A/Brisbane/59/2007 抗血清との反応性も並行して評価した。

解析した国内分離株の 99%は A/成田/1/2009 株および A/California/7/2009 株のホモ価と同じか 2-4 倍反応性が高く、抗原性は均一であった。また、孵化鶏卵分離株と MDCK 細胞分離株の間には抗原性の違いは見られなかった。このことは、新型 A/H1N1pdm ウイルスは鶏卵馴化による抗原変異は起こっていないことを示している。また、

散発的に分離された国内外のオセルタミビル耐性株も、重症死亡例から分離された株も、抗原的には A/成田/1/2009 株または

A/California/7/2009 株と区別されなかった。一方、新型 A/H1N1pdm ウイルスは、季節性 A/H1N1 ウイルス A/Brisbane/59/2007 に対する抗血清とは全く反応せず、抗原性が大きく異なっていた。現時点で A/California/7/2009 抗血清のホモ価から 4 倍程度減少した国内分離株が数株見つっているが、いずれも MDCK 細胞での継代により起こった変異であり、原株での変異ではなかった(表 2)。同様に諸外国における分離株も

A/California/7/2009 類似株がほとんどを占め、変異株が分離されているのは南半球における総解析株の 8% という最近の報告のみである。従って、世界中の新型 A/H1N1pdm ウイルスの抗原性は均一で、ワクチン株 A/California/7/2009 と類似していたといえる。

遺伝子系統樹解析：

新型 A/H1N1pdm ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析により、国内外で分離された全ての株は A/成田/1/2009 株および A/California/7/2009 株を含む単一のクラスターに属し、遺伝的にも均一であることが示された(図 5)。しかし、最近の国内株では、S203T 置換を共通に持つサブクラスターを形成する傾向を示している。A/大阪/180/2009 を除くオセルタミビル耐性株のすべては、この群に属していた。

3) 抗インフルエンザ薬耐性株

3-1) A/H1N1 ウイルス：

2007/08 シーズンには、ヨーロッパ、北米などの海外諸国で、NA 阻害剤オセルタミビルに対する耐性株が急速に広がり、大きな問題となったが、国内での発生は、数県に限られ、またその頻度は低く、解析した全ての A/H1N1 株の 2.6% 程度であった (ref. xx)。一方、2008/09 シーズンになると、わが国でも耐性株が急増し、全都道府県から検出報告があった。解析した 1482 株中 1477 株 (99.7%) が NA 蛋白に

耐性マーカー H275Y 置換を持っていた(図 6 A)。これら耐性マーカーを持つ株の 5% に相当する分離株について、化学発光系を用いた薬剤感受性試験を実施したところ、ウイルス NA 活性を半分に抑える薬剤濃度 IC50 値は、感受性株に比べて約 300 倍高く、酵素反応のうえからも耐性であることが確認された。海外諸国においても同様に、殆どの国で分離される A/H1N1 ウイルスの 95% 以上はオセルタミビル耐性となっている。我が国の 2008/09 シーズンでは、季節性 A/H1N1 は、新型 A/H1N1pdm ウイルスが出現するまでは全体の 60% 以上を占めたことから、オセルタミビル耐性は医療現場に大きな影響を与えた。一方、オセルタミビル耐性株の全ては、別の NA 阻害剤であるザナミビルに対しては、感受性を示していた。また、イオンチャンネル M2 蛋白の阻害剤アマンタジンに対しては、遺伝子解析した株のうち、国内分離株は 1/143(0.7%)、中国分離株は 48/70(69%) に耐性株が検出された。

3-2) A/H3N2 および B 型ウイルス：

2008/09 シーズンの A/H3N2 および B 型分離株のうち、それぞれ 172 株、85 株についてオセルタミビル、ザナミビル感受性試験を実施した。その結果、ザナミビルに対する感受性がやや低下した株が A/H3N2 で 6 株見られたが、これら薬剤に対する明らかな耐性株は検出されなかった。海外においても A/H3N2 および B 型では耐性株は見つっていない。一方、アマンタジンに対しては、諸外国と同様に A/H3N2 の 100% が耐性であった。

3-3) 新型 A/H1N1pdm ウイルス：

国内外で分離されている新型 A/H1N1pdm ウイルスは、すべてアマンタジンに対しては耐性である。新型ウイルスの NA と M 遺伝子がユーラシア系統のブタウイルスに由来しており、この系統のウイルスの M 遺伝子がアマンタジン耐性であることによる。一方、NA 阻害剤については、わが国では平成 21 年 10 月下旬から全国組織でオセルタミビル耐性株サーベイランスが開始される。従って、現

時点では臨床像から薬剤耐性が疑われた症例からの散発的分離例からで、5月以来8株の耐性株が見つまっている(図6B)。これらの大半は、感染者への濃厚接触後のオセルタミビル予防投与中または感染者の治療投与中に検出された。だが、札幌市で分離された耐性株は、オセルタミビル未使用の患者から分離されたもので、耐性株によるヒト-ヒト感染が疑われた事例である。今のところ、これら耐性株による家族内および周囲への感染拡大は見られていない。また、これら耐性株はすべてザナミビルに対しては感受性であった。

諸外国では、米国で10株(検出頻度0.5%)、欧州で1株、オーストラリア・東南アジア地域で1株が検出されており、日本と同様に多くはオセルタミビル予防投与中または治療投与中における薬剤選択圧によるもので、散発的な耐性株の発生であった。

2. 流行予測とワクチン株の選定 2008/09 シーズン前半には、国内外ともにA型、B型の何れについても、2008年の南半球における流行株の抗原性、遺伝子系統が殆ど変化していなかった。従って、今冬(2009/10シーズン)の北半球向けの季節性ワクチン株としては、

A/Brisbane/59/2007(H1N1)類似株、
A/Brisbane/10/2007(H3N2)類似株(日本は製造株としてA/Uruguay/716/2007を採用)、
B/Brisbane/60/2008(Victoria系統)類似株がWHOから推奨された。

一方、シーズン後半には、A/H3N2亜型ウイルスにおいて抗原性が大きく変化して、A/Perth/16/2009類似株が世界の主流となった。さらに、5月以降は新型A/H1N1pdmウイルスによるパンデミックが起り、分離株のほぼ大半を占めるようになった。季節性A/H1N1ウイルスはまだ消滅してはいないが、分離頻度は各国とも極めて低くなってきたことや、新型ウイルスに対する免疫の確保が優先されることから、WHOによる2010年の南半球向けワクチン株としては、A/H1N1亜型は季節性のソ連型から新型A/H1N1pdm株へと

置き換え、また、比較的大きな抗原変異が起こったA/H3N2ではワクチン株の変更がなされた。その結果、2010年の南半球向けのワクチン株としては、A/California/7/2009(H1N1pdm)類似株、A/Perth/16/2009(H3N2)類似株、B/Brisbane/60/2008(Victoria系統)類似株が推奨された(WER, 84, 421-436, 2009)。

3. 2008/09 シーズンのワクチン株と流行株との一致性の評価

各年度のインフルエンザワクチン株は、上記のように国内外の流行株の分析による流行予測、前年度のワクチン接種前後のヒト血清中の抗体と流行株との反応性、流行前のワクチン株に対する国民の抗体保有調査の結果

(<http://idsc.nih.gov/yosoku/Flu/Serum-Flu2008.html>)、次期ワクチン製造候補株の適性(孵化鶏卵での増殖効率および継代による抗原性、遺伝子の安定性など)などを総合的に評価して選定される。また、ワクチン株選定の時期は、2月にWHOによって決定される北半球向け推奨株を参考にして、3月末までに選定され、厚生労働省健康局長により5月から6月までに正式に決定される。従って、ワクチン株の選定は、実際の流行が始まる9-10か月前までの成績にもとづいて行われている。

株サーベイランスはWHOグローバル・サーベイランス・ネットワーク(GISN)により、地球規模で実施されるように改善されてきたため、流行予測精度が過去に比べて飛躍的に向上しているが、流行予測を早い時期に行わざるを得ないため、ワクチン株と流行株が結果的に一致しない場合がある。このような背景を踏まえて、前年度(2008/09シーズン)のワクチン株と実際の流行状況とを振り返って評価した。

2008/09シーズンに向けた本邦でのワクチン株は、A/Brisbane/59/2007(H1N1)、A/Uruguay/716/2006(H3N2)(A/Brisbane/10/2007類似株)、B/Florida/4/2006(山形系統)であり、

上記の総合分析をもとに、2008年3月に選定され、6月(?)に公表された

(<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/345/dj3452.html>)。A/H1N1 亜型ウイルスは流行最盛期(2008年12月下旬~2009年2月下旬)で94%、流行終盤(3月以降)においても85%の流行株はワクチン株と抗原性が一致していた。A/H3N2 亜型は最盛期でワクチン株との一致性は72%、終盤から第30週までの小規模流行では逆に75%がワクチン株から8倍以上の抗原変異を示していた。一方、B型のワクチン株は山形系統から選定されていたが、実際の流行株は、抗原性ではほとんど交叉反応しないVictoria系統であり、ワクチン株とは一致していなかった。ウイルス分離株の割合に基づいて算出した各ウイルスの流行比率は、新型A/H1N1pdmウイルスが発生する以前においては、A/H1N1が47%、A/H3N2が26%、B型が27%であった。この結果は、ワクチン株の一致性と各ウイルスによる流行規模は必ずしも相関していないことを示している。

現行ワクチンの皮下接種は、ウイルス感染そのものを完全には阻止できないが、個人レベルでは、重症化、死亡のリスクを減らすことが示されている。インフルエンザの流行規模は免疫保有状況のみで規定されるわけではないが、2008/09シーズンの結果は、ワクチン株が一致していても、接種率が40%を下回る状況では、現行のワクチンは社会全体における流行動態には大きな影響を与えないことを示唆している。

本研究は「厚生労働省感染症発生動向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」事業として全国76地研³⁾との共同研究として行われた。また、ワクチン株選定にあたっては、ワクチン接種前後のヒト血清中の抗体と流行株との反応性の評価のために、特定医療法人原土井病院臨床研究部池松秀之部長、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齋藤玲子博士、鈴木宏教授からの協力を得た。また、本研究には、島袋梢、松浦純子、望月菊各氏の協力を得た。海外からの情報はWHOインフルエンザ協力セ

ンター(米CDC、英国立医学研究所、豪WHO協力センター)から提供された。本稿に掲載した成績は全解析成績の中から抜粋したものであり、残りの成績は既にNESIDの病原体検出情報で各地研に還元された。また、本稿は上記研究事業の遂行にあたり、地方衛生研究所全国協議会と感染研との合意事項に基づく情報還元である。

協力研究者：

小田切孝人¹⁾、小淵正次¹⁾、岸田典子¹⁾、氏家誠¹⁾、徐紅¹⁾、高下恵美¹⁾、伊東玲子¹⁾、土井輝子¹⁾、安樂茜¹⁾、江島美穂¹⁾、菅原裕美¹⁾、加藤裕美子²⁾、小口晃央²⁾、堀川博司²⁾、藤田信之²⁾、田代真人¹⁾ 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第1室・WHOインフルエンザ協力センター¹⁾、独立行政法人製品評価技術基盤機構²⁾、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスワーキンググループ³⁾

D. 結論

2008/09シーズン最終の35週までの総分離数13,831株における分離比は、季節性A/H1N1が26%、A/H3N2が18.4%、B型が14.6%、新型A/H1N1が41%であった。

季節性のH1N1では、シーズン前半(2008年9月~2009年2月)および後半(2009年3月~8月)の分離株のそれぞれ94%、85%は、参照株でワクチン株にも選定された

A/Brisbane/59/2007と抗原性が類似していた。季節性H1N1ウイルスでは解析した1482株中1477株(99.7%)がNA蛋白に耐性マーカーH275Y置換を持ち、酵素試験でも耐性であった。

H3N2では、シーズン前半では、解析した分離株の72%がワクチン株A/Brisbane/10/2007またはA/Uruguay/716/2007類似株で占められていた。一方、シーズン後半になると、ワクチン類似株は急速に減少し、一方では、HI試験でA/Brisbane/10/2007に対する反応性が8倍以上減少したA/Perth/16類似の変異株が出現し、これが分離株の75%を占めるようになった。

B型の中で主流を占めた Victoria 系統分離株は、シーズン前半から本系統のワクチン株 B/Malaysia/2506/2004 からは抗原性が大きく変化しており、解析した分離株のほぼ全てが HI 試験で B/Malaysia/2506/2004 から 8 倍以上減少した変異株であった。

一方、4 月から流行が始まった新型 A/H1N1pdm ウイルスについては、世界中のウイルスの抗原性は均一で、ワクチン株 A/California/7/2009 と類似していた。このウイルスはブタウイルス由来で、未だ多くのトリ型の特性を保持している。これらが、年少者における重症化やアレルギー症状の誘発に関係するのであろう。H5N1 やスペインかぜウイルスに認められる病原性を規定する遺伝子変化は全く認められていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujiike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. : Isolation of Oseltamivir-Resistant Influenza A/H1N1 virus of Different Origins in Yokohama City, Japan, during the 2007-2008 Influenza Season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.

Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M. : Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) - inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199; 1629-1637, 2009

Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. : Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol. Immunol.* 53: 83-88, 2009

Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. : The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model *Vaccine*: 27, 3121-3125, 2009.

Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. : Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) *J. Med. Microbiol.* 58: 638-643, 2009.

Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato, K., Suzuki, Y. : Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Open Glycoscience*, 2: 28-36, 2009.

Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. : PolyI:PolyC₁₂U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009

Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F. : Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* 14: 751-761, 2009

WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group; Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D.,

Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. :Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.

Hishinuma-Igarashi, I., Mizuta, K., Saito, Y., Ohuchi, Y., Noda, M., Akihama, M., Sato, H., Tsukagoshi, H., Okabe, N., Tashiro, M., Kimura, H. :Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan *J. Infection.* 58: 311-313, 2009.

Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y. :Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian I influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal.* 6:124, 2009

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Bray, M., Jones, S., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Ebola virus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J. Virol.* 83: 6952-6956, 2009.

Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P. :Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461; 20-21, 2009

Mizuta, K., Hirata, A., Suto, A., Aoki, Y., Ahiko, T., Itagaki, T., Tsukagoshi, T., Morita, Y., Obuchi, M., Akiyama, M., Okabe, N., Noda, M., Tashiro, M., Kimura, H. :Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Research* 147: 265-274, 2009

Ichinohe, T., Ainai, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. :Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. :First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63; 67-71, 2010.

2. 学会発表
なし

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

新型インフルエンザ発生予測と感染制御法の検討

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

インフルエンザウイルスの増殖とそれを制御する宿主タンパク質のメカニズムを明らかにするために、発現クローニング法を開発し、ウイルス複製を抑制する宿主タンパク質 RSK2 を同定した。RSK2 は、宿主の自然免疫応答に重要な働きをもつことがわかった。

A. 研究目的

2009年初頭に起こったH1N1パンデミックを始め、高病原性H5N1鳥インフルエンザの人への感染など、早急なインフルエンザ対策が求められている。本研究では、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼに着目し、その活性に関与する宿主のタンパク質同定を目的とした。そのような宿主因子が同定されれば、ウイルス複製メカニズムを解明し抗インフルエンザウイルス薬開発に向けて重要な一歩となる。

これまでウイルスの複製に関わる宿主因子の同定は、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法が用いられており、相互作用の強い宿主因子しか同定することはできなかった。そこで、ウイルスポリメラーゼによるレポーター遺伝子の発現を指標とする発現クローニング法を開発し、ウイルス増殖に関わる宿主タンパク質を同定し解析した。

B. 研究方法

インフルエンザウイルスの遺伝子をリポ

ター遺伝子に置き換えたウイルスRNA遺伝子発現プラスミドを構築し、ウイルスのポリメラーゼタンパク質と同時に発現させた。リポーター遺伝子の発現を指標とし、宿主タンパク質の探索を行った。その結果RNA遺伝子発現を上昇させるものとしてRSK2(N末が欠損したもの)を同定した。

C. 研究結果

ウイルスポリメラーゼによるリポーター遺伝子発現は、ヒトRSK2ノックダウン細胞において上昇したことから、N末欠損したRSK2は、細胞内在するRSK2に対しドミナントネガティブに働いた可能性が示唆され、RSK2はウイルス遺伝子発現を抑制していることが示唆された。RSK2ノックダウン細胞においてA型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルスの増殖効率が上昇した。また同細胞において、NF- κ B活性化、IFN- β プロモーター活性化、PKR活性化がそれぞれ減少していることを確認した。また、インフルエンザウイルス

の感染により、RSK2 がリン酸化されることを確認した。

D. 考察

インフルエンザウイルスの感染により RSK2 は活性化し自然免疫系において重要な働きをしていることがわかった。その結果インフルエンザウイルスの複製を抑制することが示唆された。

E. 結論

インフルエンザウイルス増殖に関わる宿主タンパク質の探索系を開発し、ウイルス増殖を阻害する宿主タンパク質 RSK2 を同定した。RSK2 は、宿主抗ウイルス応答において重要な働きをもつことがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. The Mitogen-activated protein kinase-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83:2510-2517, 2009

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

インフルエンザウイルス A/(H1N1) pdm の 動物モデルでの病態解析に関する研究

研究分担者 長谷川秀樹 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

研究要旨 2009年4月メキシコ及び米国を発端にヒトでの感染が確認された新型インフルエンザウイルス A/(H1N1) pdm は瞬く間に世界的な感染の広がりを見せている。本邦においても流行シーズンを迎え感染者の数は増加し死亡例も報告された。重症例における A/(H1N1) pdm の感染病態は季節性のインフルエンザウイルスと異なる点も多く、その病原性を動物実験により調べる必要がある。我々はインフルエンザのモデル動物としてフェレットを用い米国での分離株と国内分離株を用いその病原性を調べるため感染実験を行いウイルスの増殖性、肺での病原性について調べた。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス A/(H1N1) pdm の感染後の増殖性、病原性を感染モデル動物であるフェレットで調べる事を目的とした。

X-179A（ワクチン株）季節性インフルエンザウイルス株である A/Niigata/403/09（H3N2）を用いた。それぞれのウイルス株を経鼻感染させ臨床症状、体重変化、体温変化を14日間観察した。その後安楽死させ解剖を行い病理学的解析を行った。

B. 研究方法

12ヶ月齢のフェレット（雌）10匹を用い Influenza virus A/(H1N1) pdm、ワクチン株及び A/H3N2 株の感染実験を行った。ウイルス株として、米国での分離株である A/California/7/09（H1N1）pdm（鶏卵分離株）国内最初の分離株である A/Narita/1/09（H1N1）pdm（鶏卵分離株）A/Narita/1/09（H1N1）pdm（MDCK 分離株）ワクチン株である A/California/7/09

（倫理面への配慮）

動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元行われた。

C. 研究結果

全ての野生株感染フェレットでそれぞれのウイルスの経鼻感染後体重減少を認めたがワクチン株感染フェレットでは体重減少を認めなかった。それぞれの野生株感染フ

フェレットの半数で感染 3 日目～1 週間の間で下痢を認めた。California/7 感染フェレットの 1 匹で咳を認めた。Narita/1 感染フェレットでは殆ど全てのフェレットで咳、くしゃみを認めた。体重減少は下痢を呈したフェレットで顕著で最大 14%の減少が見られた。感染 3 日目、7 日目の鼻腔および咽頭ぬぐい液で大量のウイルスゲノムを検出した。感染 7 日目の直腸ぬぐい液でウイルス分離を試みたがウイルスは認められなかった。

ウイルス感染の 14 日目の解剖時肉眼的に病変が認められたのは野性株感染の肺のみであり変色した病変を認めた。顕微鏡的観察により全ての野生株感染フェレットで気管支周囲へのリンパ球を中心とする炎症細胞浸潤が認められた。特に Narita1 (MDCK) 株感染フェレットにおいては炎症細胞浸潤が肺胞に及んでいた。更に California/7 (E2+1) 感染フェレット 1 匹では肺病変部の血管周囲に好酸球含む炎症性細胞の浸潤を認め、Narita/1 (Cl) 株感染フェレットに 1 匹で細気管支周囲及び細気管支上皮内、肺胞へ高度な好中球浸潤が認められた。ワクチン株である X-179A 感染フェレットでは肺炎像はほとんど認められなかった。

D. 考察

Influenza virus A/(H1N1) pdm California/7、Narita/1 株は共にフェレットに対して高い感染性が有り、感染後の臨床症状として体重減少、体温上昇、呼吸器症状を呈した。また細気管支周囲を主座とする炎症反応が認められ、Narita/1 株では炎症が肺胞に及んでいた。炎症はリンパ球浸潤が主体であるが、California/7、Narita/1 それぞれのウイルス株感染で個

体によっては高度な好酸球の浸潤が認められた。今回の新型インフルエンザウイルス株のヒトでの感染例で急性のウイルス性肺炎の発症や好酸球の浸潤を伴う plastic bronchitis の発生が報告されており今回の動物を用いた実験では肺への感染及び好酸球の浸潤像が見られヒトでの病態を理解する上で有用な情報が得られると考えられる。また、ワクチン株 X-179A 感染では、体重減少も病変も認められなかった。

E. 結論

新型インフルエンザウイルス A/(H1N1) pdm の病原性を動物モデルとしてフェレットを用いて調べた。A/(H1N1) pdm ヒトでの病原性との関連が示唆される所見が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32.
2. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
3. Ichinohe T, Aina A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U

adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. Vaccine. 2009 Oct 23;27(45):6276-9.

4. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. J Med Virol. 82:128-137, 2010.
5. Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M, Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. J Med Virol. 2010 Mar;82(3):476-84.
6. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):8-15.

2. 学会発表

1. 相内 章、一戸猛志、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンによおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進。第 13 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2009 年 9 月
2. 長谷川秀樹、相内 章、網 康至、永田典

代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎 隆、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討。第 13 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2009 年 9 月

3. 相内 章、伊藤 良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉 丈、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月
4. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐紅、氏家 誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木 宏、池松秀之、小田切孝人：季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月
5. 長谷川秀樹、相内 章、永田典代、岩田奈緒子、網 康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人：新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
なし
2. 実用新案登録
なし

分担研究報告書

タイ国の成人におけるパンデミックインフルエンザ関連市中肺炎
24 症例の臨床検討

研究分担者 大石和徳、大阪大学微生物病研究所

研究要旨:

2009 年 7-10 月の期間に、タイ国ピサヌロ市ブタチナラ病院において、24 例のパンデミックインフルエンザ(A/H1N1 pdm)関連市中肺炎 (CAP) 症例を経験した。年齢の中央値は 39.5 歳、大半の症例は一次性肺炎で、肺炎球菌性肺炎を示唆する症例が 1 例認められた。発症から入院までの期間は 4 日 (中央値) であり、全例入院直後に oseltamivir が投与された。24 例中、12 例は重症 CAP、9 例が ARDS と診断され、重症化傾向が顕著であった。人工呼吸器管理を含む治療の結果、19 例は生存し、5 例が死亡した。死亡例のうち 3 例が多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* による人工呼吸器関連肺炎を合併し、その死因となった。

A. 研究目的

2009 年 3 月にメキシコで発生したブタ由来 H1N1 インフルエンザウイルスは急速に全世界に拡散し、6 月 11 日には WHO は本ウイルスによるパンデミック状態に入ったことを宣言した。タイにおいては 5 月 10 日にパンデミックインフルエンザ (Pdm A/H1N1) の初発例が確認され、6 月にはタイ国内に拡散した。我々は北タイ、ピサヌロ市において 2009 年 3 月から成人の市中肺炎の疫学調査を開始し、平成 21 年 7 月から 10 月にかけて PdmH1N1 陽性肺炎 24 症例を経験し、その臨床像、治療、予後について報告する。

B. 研究方法

ピサヌロ市ブタチナラ病院の呼吸器内科、感染症科に入院し、その咽頭スワブサンプルの RT-PCR 検査で PdmH1N1 陽性で、胸部X

線で肺炎所見を確認した成人市中肺炎(CAP)例 24 例を対象とした。これらの症例に対し、血液培養、喀痰細菌培養、肺炎球菌尿中抗原検査を実施した。肺炎の重症度は IDSA/ATS ガイドラインに従い重症 CAP を診断した。ARDS の診断は米国—欧州のコンセンサス会議の診断基準に準拠した。本研究はブタチナラ病院の倫理委員会の審査を受け、承認された。

C. 研究結果

2009 年の 7 月から 10 月にかけて、pdm H1N1 感染による 24 例の成人 CAP 症例を経験し、その年齢の中央値は 39.5 歳 (18-71 歳) で、75% が 50 歳未満であった。66.7% に肥満、COPD、喘息、糖尿病などの併存症があり、臨床症状では約 30% に下痢が認められた。入院時の検査では、喀痰培養で大腸菌 + 肺炎桿菌が 1 例、肺炎桿菌と

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) が1例に検出され、血液培養はすべて陰性であった。尿中肺炎球菌抗原は24例中1例のみに検出された。末梢血白血球数の中央値は7,165/mm³で、胸部X線では79.2%で多肺葉あるいは両肺の浸潤影を認めた。12例が重症CAP、9例がARDSと診断され、重症例が多かった。人工呼吸器管理を含む治療後に、24例中19例は生存し、5例(20.8%)が死亡した。発症から入院までの期間は4日(中央値)で、oseltamivirは全例において入院直後に投与された。全体の87.5%で抗菌薬が投与され、重症CAP12例中9例はステロイド(dexamethasone 16-24 mg/日)を投与された。9例のARDS中、5例が生存した。生存した5例の人工呼吸器装着期間は7日(中央値)であり、死亡4例では13.5日(中央値)と長かった。入院中、1例のARDS例が人工呼吸器使用後に多剤耐性の*A. baumannii*の病院関連肺炎を発症したが治癒した。一方、別のARDSの3症例は*A. baumannii*による人工呼吸器関連肺炎(VAP)を発症し、多剤抗菌薬による治療にかかわらず、敗血症を合併し死亡した。また、1例は急性心筋炎疑い、1例は誤嚥性肺炎で死亡した。24例中の生存例と死亡例の比較から、重症CAP($P=0.019$)、ARDS($P=0.047$)、VAP($P=0.005$)の発生が死亡のリスク因子と考えられた。

D. 考察

タイにおける成人のpdm H1N1によるCAPの病像は、罹患年齢、その重症化傾向はメキシコ、米国からの既報と同様であった。タイにおいては、これまで医師および国民

が oseltamivir の使用経験がほとんど無いこともあり、今回の24症例中、全ての症例において oseltamivir の投与は発症4日以降と遅れていた。この治療の遅れは、肺炎例の重症化に関連すると考えられた。また、今回の24症例の大半はウイルス性肺炎と考えられ、1例において肺炎球菌肺炎が疑われた。二次性肺炎が比較的小さいことは既報と一致する結果である。一方、米国では77剖検例中、22例に二次性肺炎が認められており、発生頻度は低いものの、重症化例では肺炎球菌を含む二次感染が発生するものと考えられた。今回の5死亡例中、3例に多剤耐性の*A. baumannii*によるVAPの合併が見られた。本菌はタイ国内の院内感染菌として問題化しており、本菌によるHAPやVAPの合併については、重症化傾向の高いpdm H1N1関連肺炎の治療においては、人工呼吸器管理期間の短縮化を含む十分な院内感染対策が必要である。

E. 結論

2009年7月から10月にかけて、タイ国、ピサヌロ市の3次病院において、24症例のpdm H1N1関連成人CAPを経験した。タイ国

においては、抗ウイルス療法の遅れにより、CAP 症例は重症化傾向を示した。また、ARDS 治療中の *A. baumannii* による VAP の合併がその死亡リスクとなる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, Kataoka K, Oishi K. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-Like Receptor Agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine* 27:3181-3188, 2009

2. Akeda Y, Okayama K, Kimura T, Dryselius R, Kodama T, Oishi K, Iida T, Honda T. Identification and characterization of a type III secretion-associated chaperone in the type III secretion 1 of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 296:18-25, 2009

3. Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, Nakamura S, Uchida R, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Clonal Dissemination of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand. *J Med Microbiol* 58:1508-1513, 2009

4. Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales

PA, Alonzo MTG, Suarez LC, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. Increased platelet phagocytosis from patients with secondary dengue virus Infection by human macrophages. *Am J Trop Med Hyg* 80:841-845, 2009

5. Inoue S, Alonzo MTG, Kurosawa Y, Mapua CA, Reyes JD, Dimaano EM, Alera MTP, Saito M, Oishi K, Hasebe F, Matias RR, Natividad FF, Mrita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonotic Dis* Oct 29, [Epub ahead of print], 2009

6. 大石和徳. SARS はどうなったのか？ 呼吸と循環. 57: 607-611, 2009

7. 大石和徳、川上和義、永井英明、砂川慶介、渡辺 彰. 肺炎球菌ワクチン再接種承認の必要性に関するアンケート調査研究. *日本呼吸器学会雑誌* 48(1): 5-19, 2010.

8. 川上健司、大石和徳. 肺炎球菌ワクチン-再接種の副反応と有用性-. *Medical Practice*. 26 (7):1161-1164, 2009.

9. 大石和徳. 23 価肺炎球菌ワクチン. 内科. 104(5):872-875, 2009.

10. 大石和徳. SARS. VIRUS REPORT. 6(2):144-149, 2009.

2. 学会発表

1. 大島信治、永井英明、大石和徳他. 慢性呼吸器疾患患者への 23 価肺炎球菌ワクチン接種前後および 5 年経過後の血清型特異抗体濃度の検討. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009 年 6 月 12-14 日.

2. 川上健司、大石和徳. 65 歳以上の成人における肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果に関する検討. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009 年 6 月 12-14 日.

3. 坂東園子、岩垣明隆、内田隆一、大日康史、江澤和彦、大石和徳. 高齢者介護保険施設利用者を対象とした肺炎の向き調査. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009 年 6 月 12-14 日.

4. 内田隆一、川上和義、大石和徳. タイの小児は肺炎の鼻咽頭・細菌ウイルスと画像・臨床像の解析. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009 年 6 月 12-14 日.

5. 江副浩和、大間敬太、明田幸宏、大石和徳. マウス肺炎モデルを場とした PspA に対する TLR ligand の粘膜ジュバント効果. 日本感染症学会, 東京, 2009

年 4 月 23-24 日.

6. 大石和徳. 40 年ぶりに発生した新型インフルエンザ: その対策の検証. 第 103 回日本呼吸器学会近畿地方会, 奈良, 2009 年 7 月 18 日.

7. 大石和徳. 東南アジアで注目される *Streptococcus suis* 感染症. 第 58 回日本感染症学会、第 56 回日本化学療法学会、東京、2009 年 10 月 30-31 日.

8. 大石和徳. 高齢者における肺炎予防ワクチンの現状と課題. 第 58 回日本感染症学会、第 56 回日本化学療法学会、東京、2009 年 10 月 30-31 日.

9. 大石和徳、永井英明、川上和義. 肺炎球菌ワクチンの再接種の実態とその承認の必要性に関するアンケート調査. 第 13 回日本ワクチン学会、札幌. 2009 年 9 月 26-27 日.

10. 川上健司、大日康史、大石和徳. 65 歳以上のインフルエンザワクチン定期接種下の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンの臨床・費用対効果. 第 13 回日本ワクチン学会、札幌. 2009 年 9 月 26-27 日.

11. 朴 貞玉、江副浩和、大間敬太、明田幸宏、大石和徳. マウス致死性肺炎モデルにおける PspA と TLR ligand 併用による経鼻粘膜ワクチンの効果. 第 52 回日本感染症学会中日本地方会、第 57 回日本化学療法学会西日本支部総会、名古屋. 2009 年 11 月 26-28 日.

12. Oishi K. Immune mechanisms of thrombocytopenia in secondary dengue virus

infections. Emerging Infectious Diseases 2009.8-11 December, 2009, Singapore.

13. Verathamjamras C, Puangpatra P, Oishi K, et al. Clinical and Microbiological Study on Acute Lower Respiratory Tract Infection among Children in Bangkok. International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand. Sep 16-17, 2009.

14. Oishi K, Anusak K, et al. Clinical and microbiological features of *Streptococcus suis* infections in humans living in Thailand. International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand. Sep 16-17, 2009.

15. Alonzo, Honda S, Maito M, Dimaano E, Matias R, Natividad F, Oishi K. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. The 9 th World Congress on Inflammation, Tokyo. July 6-10, 2009.

16. Oishi K. Impact of severity of 2009 pandemic influenza H1N1-associated community-acquired pneumonia among

adults in Phistanulok, Thailand. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infection Panel. January 25-26, 2010, San Francisco, USA.

17. Akeda Y, Ezoe H, Oishi K. Protection of fatal secondary pneumococcal infection following influenza virus infection by PspA immunization. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infection Panel. January 25-26, 2010, San Francisco, USA.

H. 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：なし

本邦に於けるオセルタミビル耐性株頻度と、オセルタミビル耐性株 に対するオセルタミビルの臨床効果

研究分担者 鈴木 宏

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・教授

共同研究者： 齋藤玲子、鈴木康司、Tatiana Baranovich、Hassan Zaraket、Clyde Dapat、
Isolde Dapat、鈴木宏（新潟大学）

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、2008-09年に本邦多施設（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。2008-09年は100% (693/693件)のH1N1がNA蛋白274位 His→Tyr 変異をオセルタミビル耐性であった。

NA蛋白274位変異によるオセルタミビル耐性株罹患小児に対して、オセルタミビルを投与した際の解熱効果を、非投与群やザナミビル投与群と比較し15才以下で検討したところ、タミフル投与群の熱経過は非投与群と同様で、明らかに遷延していた。過去に採取されたオセルタミビル感受性株罹患小児で、オセルタミビル投与群と非投与群の熱経過を比較したところ、オセルタミビル投与群は速やかな解熱を示していた。このためNA蛋白274位変異による耐性化により、オセルタミビルの効果が減弱していることが判明した。

近年のA型インフルエンザでは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。

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、2008-09年は世界各国でオセルタミビル耐性H1N1株が主流の流行を起こした。

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、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に、オセルタミビル、又はザナミビル治療した際の臨床経過を無治療群と比較した。耐性株と比較するために、過去 2 シーズン採取されたオセルタミビル感受性株罹患患者に対する薬剤投与の効果についても比較検討を行った。

B. 研究方法

2008-09 年は、7 県 18 医療機関（北海道、新潟、群馬、京都、兵庫、鳥取、長崎）で、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、無治療）を記録した。

患者の熱経過については、小児科のみで記録した。オセルタミビル、ザナミビルの 1 日あたりの処方本邦の小児の投与量に準じ、原則的に 5 日間投与とした。経過記録は保護者が記録し、受診後の患児の体温の 1 日 3 回計測値（9 時、12 時、20 時）を最高 6 日まで記録した。解熱鎮痛剤は、38°C 以上発熱したときのみ頓服で用いた。

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、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。

患者の臨床経過記録は、1 日 3 回計測した体温中の最高値を用い、受診後各日の平均値を計算した。1 日の最高体温を用いたのは、解熱鎮痛剤による一時的な体温低下の影響を除去するためである。2 群間の平均値の有意差検定には T 検定を用い、3 群間の平均値の検定については Scheffe の解析を用いた。なお、解析に当たっては第一病日の体温が 37.5°C 以上の患者を対象とした。

耐性株に対して、オセルタミビル感受性株の熱経過を比較するため、同様の手法で採取された 2006-07 年、2007-08 年の H1N1 罹患患者のオセルタミビル投与群と無投与群の経過記録も解析した。

（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

2008/09 年シーズンは、全体として H1N1 が主流の流行を示しており、流行株の 62.6% (693/1106 株) をしめた（表 1）。次に H3N2 が多く 26.7% (295/1106 株) であり、B 型が 118 件（10.7%）であった。H1N1 は全て、ノイラミニダーゼ蛋白 274 位の変異 Hys→Tyr をもつウイルスであったが、アマンタジンには感受性であった。一方、H3N2 は全て M2 蛋白遺伝子変異をもつアマンタジン耐性株であった。H1N1 ウイルスに対して、ノイラミニダーゼ阻害試験（IC50）を行ったところ、274 位変異をしめたウイルス

はオセルタミビルに対する薬剤阻止濃度が 949nM と、感受性株 (2.49nM) に対して 400 倍近く上昇しており、オセルタミビル耐性であった。しかし、ザナミビルに対しては感受性であった。ヘマグルチニン遺伝子とノイラミニダーゼ遺伝子の樹形図解析を行ったところ、2008-09 年シーズンの H1N1 は、全て WHO 分類の Clade 2B に属し、ノイラミニダーゼ遺伝子に 274 位と 357 位に変異をもち、HA 遺伝子には 193 位に変異が生じており、一つの特徴的な群を形成していた (Subclade 2B.11 と命名) 6) (図 1)。

一方、オセルタミビル耐性株患者の治療効果の解析については、2008-09 年の 15 才以下のオセルタミビル耐性 H1N1 罹患者のうち、87 名のオセルタミビル治療群、64 名のザナミビル治療群、87 名の無治療群の経過が得られた。熱経過は、受診日を第 1 日として第 6 日までを比較した。

結果として、オセルタミビル耐性群に対してオセルタミビル治療を行った群では、熱型が無治療群とほぼ同様の経過となっており、治療効果が減弱していることが判明した (図 2)。一方、ザナミビルは、速やかな解熱をしめした。

それに対して、過去の 2006-07 年と、2007-08 年のオセルタミビル感受性株罹患者のうち、60 名のオセルタミビル投与群と 50 名の無治療群の熱経過を比較したところ、オセルタミビル投与群では無治療群に比して、有意な解熱を示しており、オセルタミビルの治療効果が確認された (図 3)。

D. 考察

我々の調査で、2008-09 年に本邦では全ての H1N1 が NA 蛋白 274 位変異をもつタミフル耐性株であったことが判明した (100%)。

前シーズンの 2007-08 年には、本邦ではアマンタジン耐性株である Clade 2C 群と、感受性株とオセルタミビル耐性が混在する

Subclade 2B.1 群の二つの群の流行が見られた (図 1)。しかし、同シーズン中からすでにタミフル耐性頻度の高い北欧諸国を中心に、ノイラミニダーゼ遺伝子の 357 位の変異が入った別個の群のウイルスが報告されていた。2008-09 年に、日本で流行したオセルタミビル耐性 H1N1 は、基本的にはこの北欧系に属し、ヘマグルチニン遺伝子の 193 位にさらに変異が見られていた (Subclade 2B.11)。

この HA 蛋白 193 位の変異は、以前に大流行したアマンタジン耐性 H1N1 及び H3N2 と共通しているため非常に興味深い。というのは、この HA 蛋白変異が耐性インフルエンザの伝播率を向上させる可能性があるためである。今後、他の内部遺伝子との協働も含め、さらなるウイルス学的な解析が必要である。

臨床経過の解析結果から、オセルタミビル耐性株に対してオセルタミビル治療を行った場合の、解熱経過は無治療群と同じとなり、オセルタミビルの有効性がみられなかった。過去のオセルタミビル感受性群では、明らかに無治療群に比してオセルタミビル投与群は有意に早く解熱しており有効性が確認されている。このため、NA 蛋白 274 位変異のオセルタミビル耐性株では、オセルタミビルの効果が減弱していることが示された。これは、NA 蛋白 274 位変異の阻止濃度が 949nM である一方で、オセルタミビルの投与 4-12 時間後の血中濃度が 400-800nM とさがり、時間帯によっては耐性株の阻止濃度の方が上回ってしまうことが原因と考えられる。ザナミビルに関しては、小さい子供では吸入が難しいことから投与の対象年齢がオセルタミビルより高かった (7-15 才)。一方で、オセルタミビルは、神経系の副作用のため、10 代の投与が禁忌となっている。このため、オセルタミビルと、ザナミビルの投与群の年齢層が違って