

いたため、直接の比較がむずかしく、現在多変量解析を含め、さらなる解析をすすめている。しかし、7才未満の小児で比較した場合に、タミフル耐性群での無治療群に対するタミフルの効果減弱は明かであり、結果は確固たるものであると考える。

2008-09年は、臨床医としては、抗インフルエンザ剤の選択が難しいシーズンであった。全国的にタミフル耐性H1N1株が流行の7割、アマンタジン耐性H3N2が3割を占め、さらにタミフルと、ザナミビルの投与年齢制限もあり、混乱した状況であった。我々の調査では、海外株からこれまで知られていない新しい変異による耐性株が次々と見つかり、今後もA型インフルエンザでは耐性インフルエンザの流行が続くことが考えられる。臨床経過の評価も含め、今後も継続した調査が必要と考えられる。

#### E. 結論

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。

オセルタミビル耐性株罹患小児にオセルタミビルの投与を行った場合、効果が減弱し、薬剤無投与とほぼ同じ熱経過となることが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki, Y, Saito, R, Zaraket, H, Dapat, C, Caperig-Dapat, I, Suzuki, H. Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method. *J Clin Microbiol.* 48 (1):57-63, 2010.

2. Shobugawa, Y, Saito, R, Sano, Y, Zaraket, H, Suzuki, Y, Kumaki, A, Dapat,

I, Oguma, T, Yamaguchi, M, Suzuki, H. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol.* 47 (8):2475-2482, 2009.

##### 2. 学会発表

1. Tatiana Baranovich, Reiko Saito, Yasushi Suzuki, Clyde Dapat, Isolde Dapat, and Hiroshi Suzuki. Dynamics of antiviral-resistant seasonal influenza A(H1N1) viruses and clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir in children with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. 14th Annual Meeting. January 25-26, 2010. San Francisco, California, U.S.A.

2. Tatiana Baranovich、鈴木康司、齋藤玲子、Hassan Zaraket、DapatClyde、Isolde Dapat、小熊妙子、佐藤 勇、川島 崇、石谷暢男、日比成美、生嶋 聡、藤原史博、綱本健太郎、橋田哲夫、出川 聡、白髭 豊、星野和彦、真崎宏則、鈴木 宏. Emergence and spread of H274Y oseltamivir-resistant A (H1N1) influenza viruses in seven areas in Japan, 2008-09 season. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009年10月25-27日. 東京

#### 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

表1. 2008/09シーズンにおけるインフルエンザウイルスの薬剤耐性株発生頻度

調査地	A型インフルエンザ					B型 インフルエンザ 分離株数
	A/H1N1			A/H3N2		
	分離株数	オセルタミビル 耐性	アマンタジン 耐性	分離株数	アマンタジン 耐性	
北海道	22	22/22 (100%)	0/22 (0%)	1	1/1 (100%)	0
新潟	280	280/280 (100%)	0/280 (0%)	28	28/28 (100%)	71
群馬	7	7/7 (100%)	0/7 (0%)	5	5/5 (100%)	6
京都	209	209/209 (100%)	0/209 (0%)	147	147/147 (100%)	27
兵庫	57	57/57 (100%)	0/57 (0%)	22	22/22 (100%)	3
鳥取	43	43/43 (100%)	0/43 (0%)	67	67/67 (100%)	7
長崎	75	75/75 (100%)	0/75 (0%)	25	25/25 (100%)	4
合計	693/1106 (62.6%)	693/693 (100%)	0/693 (0%)	295/1106 (26.7%)	295/295 (100%)	118/1106 (10.7%)

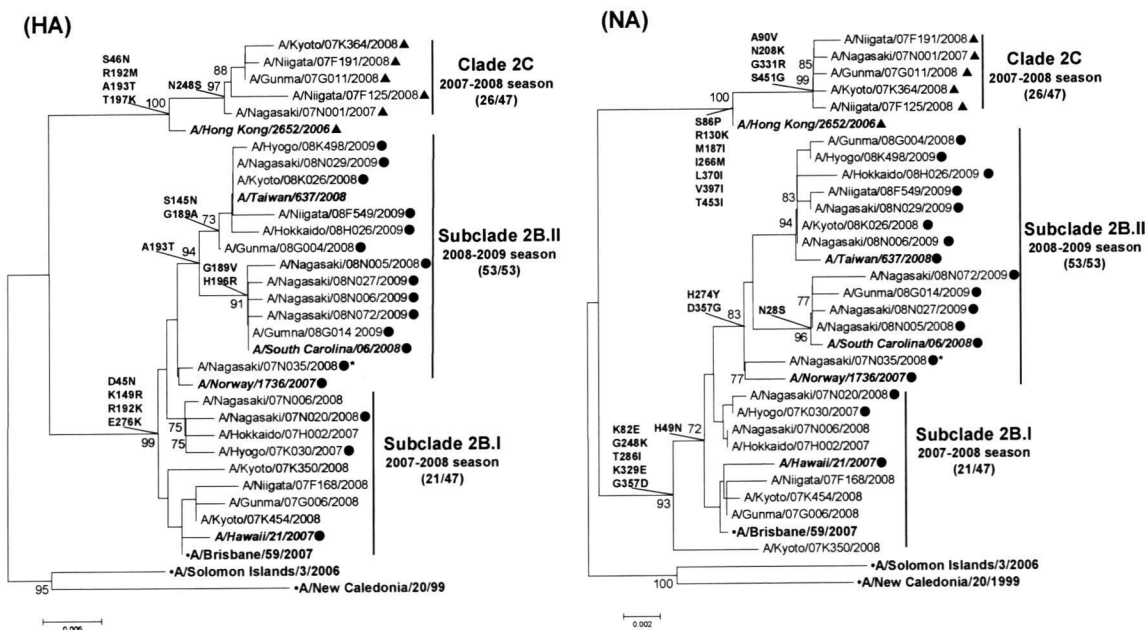


図1. 2008-09年シーズンのH1N1の遺伝子解析(HA遺伝子、NA遺伝子)

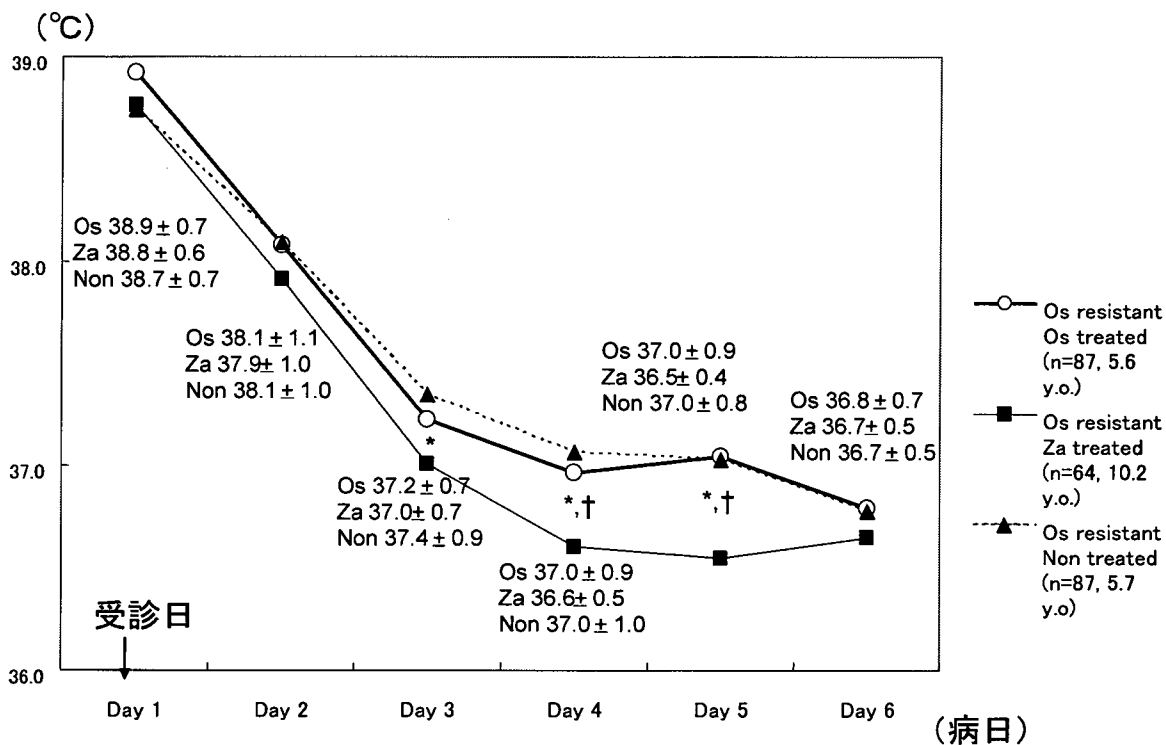


図 2. オセルタミビル耐性 H1N1 感染に対するオセルタミビル、ザナミビルの治療効果 (15 才以下小児)

\* ザナミビル対無治療群  $p < 0.05$ , † オセルタミビル対ザナミビル  $p < 0.05$

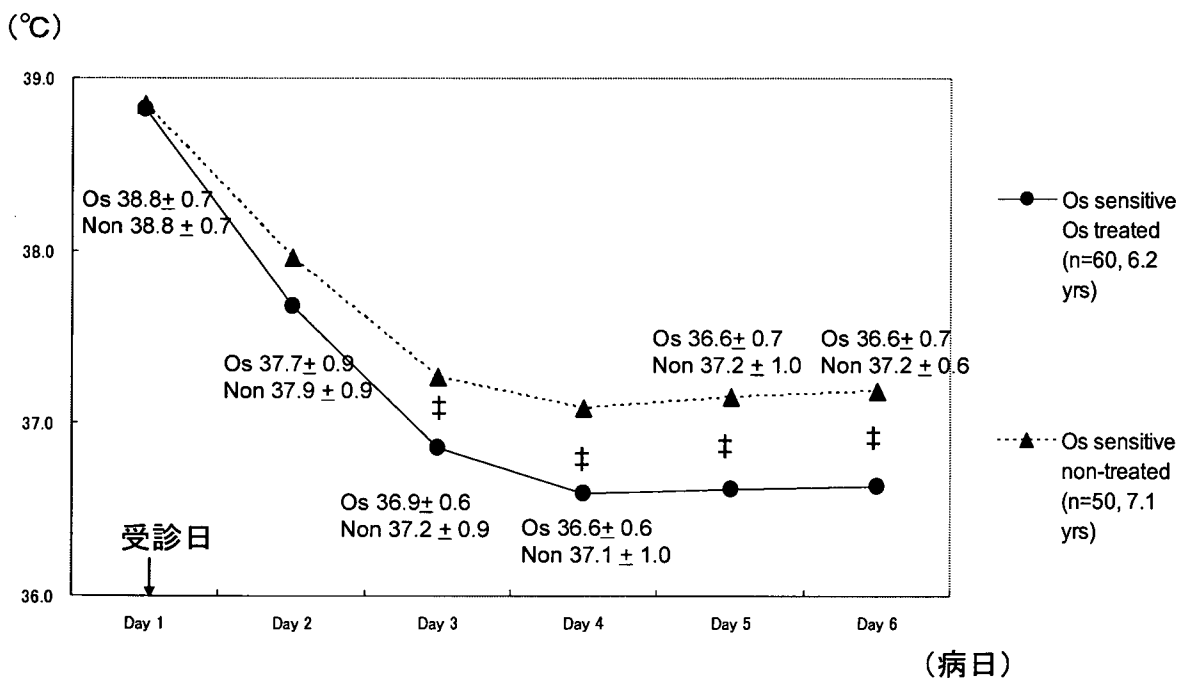


図 3. オセルタミビル感受性 H1N1 感染に対するオセルタミビルの治療効果 (15 才以下小児)

‡ オセルタミビル対無治療群  $p < 0.01$

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

ジオデモグラフィックスを用いた  
インフルエンザ地域流行の特徴分析

研究分担者 新潟大学大学院 医歯学系 講師 齋藤玲子  
研究協力者 木村義成 1)、小野靖彦 2)、辻本善樹 2)、高原 晶 2)、中谷友樹 3)  
佐々木諭 4)、鈴木 宏 4)  
1) 大阪市立大学文学部、2) 諫早医師会、3) 立命館大学文学部、  
4) 新潟大学大学院医歯学系

研究要旨

インフルエンザがコミュニティでどのような地域に流行するのか明らかではない。我々は、日本のある都市のインフルエンザ全数把握調査と、ジオデモグラフィックスという地理学的手法を組み合わせ、インフルエンザの発生数が多い地域と少ない地域の特徴を明らかにした。ジオデモグラフィックスによる大字のレベルの小地域分析を行ったところ、A型、B型インフルエンザともに、子供のいる若い家族が多い地域で発生が多く、農村部の高齢化した地域で少なかった。このジオデモグラフィックスという地理学的手法は感染症の解析として新しい切り口であり、今後行政のインフルエンザ対策案の一助ともなると考えられ、今後の解析の発展が期待される。

A. 研究目的

インフルエンザは毎年冬に流行を起し、多くの健康被害をもたらす。しかし、地域においてどこにインフルエンザ患者が多くなるか詳細な検討はされていない。

長崎県諫早市では、医師会の主導のもと、市内の 70-90 の医療機関が参加してインフルエンザ患者の全数登録事業を 2003 年から行っている。

ジオデモグラフィックスは地理学のあたらしい手法の一つである。小地域に住む住民集団は、年齢、家族構成、収入、消費動向

など似たような性質をもつという概念に基づき、地区の類型分類を行う手法である。主にマーケティング分野で用いられ、例えばダイレクトメールをどの地域に送るのが最も会員取得に効率がよいかなどに用いられてきた。健康分野では、“inequality of life”を解析するために用いられることもあるが、感染症の分野での解析はこれまで全くなされていない。

本研究では、ジオデモグラフィックス分類を使って、インフルエンザが起りやすい、または起りにくい小地域を、諫早医師会

のインフルエンザ全数登録事業のデータを用いて特定した。

## B. 研究方法

諫早市医師会では、市内の医療機関の協力の下、諫早市内で受診したインフルエンザ患者の全数調査を行っている。2004-05年～2007-08年の4シーズンに、諫早市内の約70-90の医療機関を受診したインフルエンザ様疾患患者の、年齢、性別、大字住所、発症日、受診日、迅速診断キットの結果を記録した。各医院からのデータは、諫早医師会を入力し、新潟大学にて、解析した。今回は旧諫早市地区と多良見地区のデータのみ解析した。

はじめに、調査地域全体人口から、インフルエンザ患者の罹患率(%)を、迅速診断キットのA型、B型別、年齢別、シーズン別に算出した。さらに、大字別のA、B型インフルエンザ発生数(人)をA、B型別、シーズン別に計算した。

次に、ジオデモグラフィックス解析を行った。ジオデモグラフィックス解析のベースマップとしては、日本の大字を11のグループと50のタイプに類型化したMosaic Japan®を用いた(表1)。モザイク・ジャパン®地図により、諫早市の全ての大字区域が大分類である11のモザイクタイプのいずれか、小分類である50のモザイクタイプのいずれかに分類された(図1、タイプ細分は省略)。それにしたがって、モザイク大分類と小分類の人口数、インフルエンザ発生数を計算し、観測値/期待値で計算される指標であるIndex Value (IV)を算出して各モザイク・グループ又はタイプ中のインフルエンザ発生数を算出した。

Index Value (IV)の計算式は以下を用いた。

$$IV = \frac{\text{観察数}}{\text{期待数}} \times 100$$

期待数=全年齢インフルエンザ罹患頻度×モザイクグループ(タイプ)内の人口。例えばIVが100であれば、期待値と発生数が同じであることを示し、120であれば、発生数が期待値より20%多いことを示す。

IVの統計的有意差については $\chi^2$ 乗検定を用いた。

### (倫理面への配慮)

患者には各医院で十分な説明を行い了解を得た。収集された情報は医療機関や学校、保健所で共有され、地域流行を把握する重要な情報源となっており、患者にもその旨了解を得ている。

## C. 研究結果

2004-05年は、A型とB型の混合流行、2005-06年はA型の流行、2006-07年はA型B型の混合流行、2007-08年はA型のみ流行であった。

2004-05年シーズンのインフルエンザ罹患率はA型1.5%、B型2.6%、2005-06年の罹患率はA型3.0%、2006-07年のA型罹患率は3.0%、B型罹患率は1.8%、2007-08年のA型罹患率は2.6%であり、期間を通じてA型罹患率平均は2.5%、B型平均罹患率は1.1%であった。A型、B型共に5-9才の罹患率が最も高く、毎シーズン7-14%であった。

ジオデモグラフィックスによる解析結果では、4シーズン全てを通して、A型インフルエンザの罹患数が、期待値より統計的有意差をもって高くなったのは、G 勤労者世帯であった(表2)。H 公団住宅者、I 職住近接・工場町は、2シーズンのみ有意にインフルエンザ発生が高かった。一方、インフルエンザ発生が有意に少なかった地域は4シーズンを通じてJ 農村及びその周辺地域、K 過疎地域であり、1シーズンのみ有意に少なかったのは、D 下町地域、F 会社役

員・高級住宅地、H 公団居住者であった。

50 細分のモザイクタイプで A 型罹患数を見たところ、4 シーズンを通じて G28 社宅の多いベッドタウンが、有意に発生が多く、3 シーズンで発生が多かったのは、F27 新興住宅居住者であり、2 シーズンでは E21 地方ニューファミリー、G29 工場労働者、G30 若年勤労者世帯、H33 社会福祉受給者、I40 工場隣接集合住宅が多かった。

B 型インフルエンザについては、B 型の流行があった 2004-05 年と 2006-07 年のみ解析を行い、患者発生数がわずかである 2005-06 年と 2007-08 年は除外した。2 シーズンとも有意にインフルエンザ罹患数が多かったのは、G 勤労者世帯、1 シーズン高かったのは I 職住近接・工場町であった。逆に B 型インフルエンザ発生が少なかったのは、J 農村及びその周辺地域が 2 シーズン続けて、F 会社役員・高級住宅地、H 公団居住者、K 過疎地域は 1 シーズンのみ有意に発生が少なかった。

50 細分類では、2 シーズンとも発生が高かった類型はなかったが、E18 農業地域のサービス業、E 田舎の集落、F27 新興住宅居住者、F28 社宅の多いベッドタウン、G29 工場労働者、G30 若年勤労者、I40 工場隣接集合住宅、K48 昔ながらの田舎町で有意に多かった。B 型インフルエンザ発生が少なかったのは、2 シーズン続けて F24 会社役員、J43 地方のシルバー世代、K46 地方高齢者地域であり、1 シーズンのみ有意に少なかったのは、D13 木造長屋、H33 社会福祉受給者、J42 小さな町の中心地、J44 田舎周辺の町、K47 田舎で農業以外の産業のある町であった。

#### D. 考察

地域のインフルエンザ全数把握調査と、ジオデモグラフィクスの手法を用い、イン

フルエンザ発生が多い地域類型と、発生が少ない地域類型を解析した。結果として 4 シーズンを通じ、インフルエンザの発生が有意に多い地域は市の中心部に近い、子供のいる若い家族が多い地域であった。逆にインフルエンザの罹患が少ない地域は、高齢者の多い過疎地域であった。この所見は A 型、B 型共に共通していた。この傾向は、モザイク・グループの細分類であるモザイクタイプで解析した際にさらに明かとなり、子供の多い家族がいる地域や集合住宅のある都市の中心地域でインフルエンザが多く、年齢構成として壮年または高齢者が中心となる農村などの周辺地域では、インフルエンザ罹患が少なかった。

一般的に人口が多い地域ではインフルエンザの罹患が多いことが知られており、さらに我々の調査の罹患率の計算でも明かであるように、子供がインフルエンザの地域流行の主体を占めることは明白である。しかし、実際に地理的に解析を行うとなると、どこが子供が多い地域か少ない地域かという分類を行う必要がある。今回の解析では、ジオデモグラフィクスという地理学の手法を用い、地区の人口構成のみでなく、社会的な要因（収入や住環境など）も考慮に入れた小地域分類を行うことで、A 型及び B 型インフルエンザが発生しやすい、または発生しにくい地域の地区類型を見いだすことができた。

長崎県諫早市では、医師会主導でインフルエンザ全数調査を行っている。サーベイランスに比して参加医療機関が多く、内科の受診状況も把握でき、地域での全年齢でのインフルエンザ流行の把握ができる貴重な調査である。新潟大学では受診した患者の大字レベルの住所情報から週ごとの患者分布地図を作成し地域の流行地域の把握に貢献している。特に学区ごとの流行把握は地域に大きく評価されている。これまでの

地図作成の結果から、漠然と若い家族の多いニュータウン地域では発生が多いとか、農村地域ではインフルエンザ患者があまり発生していないことがわかっていたが、今回、ジオデモグラフィックスの概念を導入することで、罹患の大小の地域の特徴をはっきりと浮き彫り（プロファイリング）することができた。

モザイクジャパンは、全国の全ての大字が分類されているため、今回の解析は1地域の結果にとどまらず、他の地域のインフルエンザ発生予想として使うことができる。最終的にはこの手法をつかって解析することで新型インフルエンザの地域対応に応用することも可能である。どの地域に抗インフルエンザ剤やワクチンを優先的に配備すべきかを割り出すことも可能で、行政の対応の一助になると考えられる。

#### E. 結論

長崎県諫早医師会では、毎年インフルエンザ患者の全数登録を行い、地域での患者発生動向の把握に貢献している。ジオデモグラフィックスの手法を用い、インフルエンザ罹患の多いまたは少ない地域を特定した。子供のいる若い家族が住む地域でインフルエンザ発生が多く、過疎地域・農村地域では発生が少なかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. Reiko Saito, Yoshinari Kimura, Yasuhiko Ono, Satoshi Sasaki, Takako Suzuki, Yoshiki Tsujimoto, and Akira Takahara, and Hiroshi Suzuki. Area profiling for seasonal and pandemic

influenza patient occurrence using a community wide influenza registration program. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. 14th Annual Meeting. January 25-26, 2010. San Francisco, California, U.S.A.

2. 木村義成、中谷友樹、齋藤玲子、鈴木宏. 記述疫学分析における GIS とジオデモグラフィックス・データの利用. 第四回保健医療 GIS 国際シンポジウム. 2009年3月5日. 新潟

#### 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

なし

表 1. Mosaic Japan®の地区プロフィール

日本全国が大字単位で A-K まで 11 大分類（グループ）されている

Mosaic Group	Group description	Neighborhood profile
A	大都市のエリート指向	Metropolitan Careerists tend to be under forty and earn a very high income. Many of them fall into the top tax bracket.
B	入社数年の若手社員	Young families with children living in modern apartments in the new residential areas of small cities and the suburbs of large cities.
C	大学とその周辺	Campus Lifestyles are found in relatively small towns, where college or graduate students live. These areas are sometimes research
D	下町地域	Typical inner areas of small or middle sized cities, where many old people over sixty have lived for more than twenty years.
E	地方都市	A balanced mixture of different types of people, including young families and middle-age families, living in typical Japanese towns.
F	会社役員・高級住宅地	Employees of well-established corporations, who have worked their way up the ranks and obtained a certain level of social status.
G	勤労世帯	Families in their 30s and 40s that have recently moved into detached houses and apartments in new residential areas to raise their
H	公団居住者	Low wage earners living in large cities in middle to large apartment blocks of social housing developed by local authorities.
I	職住近接・工場町	Small industrial towns whose main business is in the manufacturing industry and many residents are skilled workers in local factories.
J	農村およびその周辺地域	Periphery of cities or areas close to provincial cities, where many residents work in the agricultural
K	過疎地域	People living in agricultural villages, which are remote from urban areas and sometimes totally isolated from the outside world.

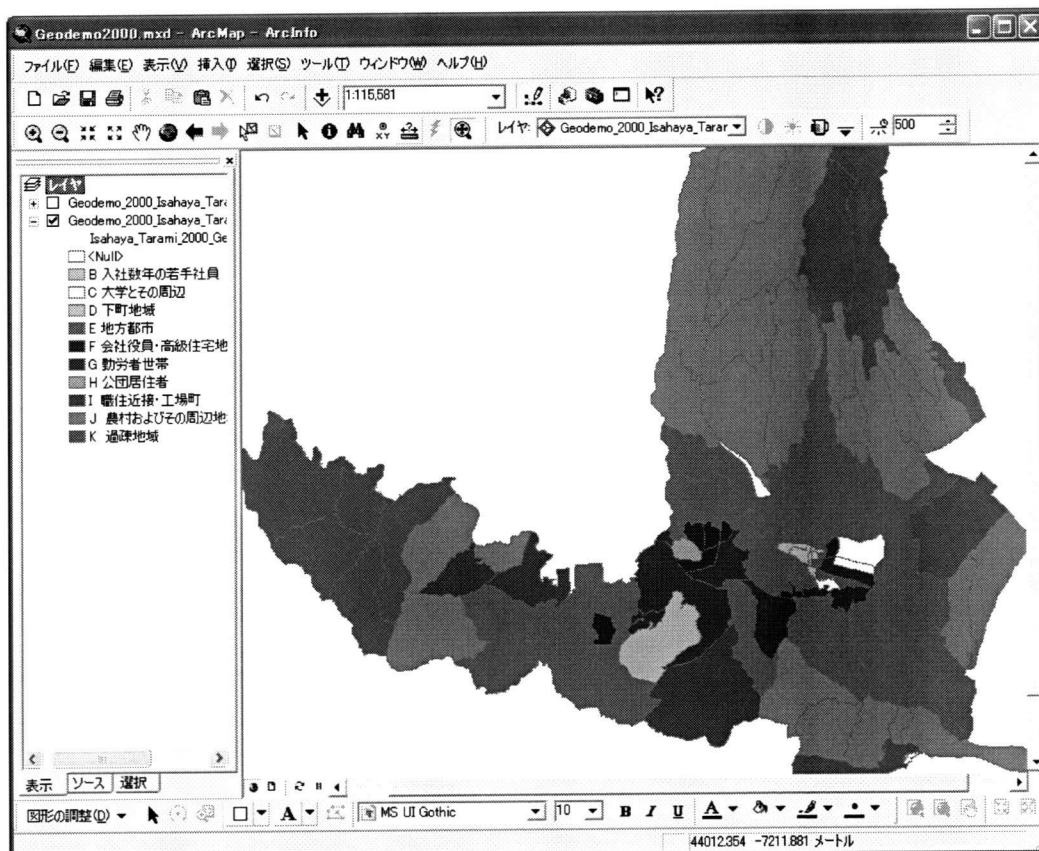


図 1. 調査地域の大字別のモザイク・グループ分類 (B-K)



表2. モザイク・グループとインフルエンザ A 型及び B 型罹患指数(Index Value)との関係

A型

Type A		2004-2005			2005-2006			2006-2007			2007-2008			
Type	Description	Index	Chi-Square	Vd	P Value	Index	Chi-Square	P Value	Index	Chi-Square	P Value	Index	Chi-Square	P Value
B	入社数年の若手社員	0	0.22			0	0.45		0	0.45		0	0.38	
C	大学とその周辺	179	2.44			64	1.03		90	0.08		134	0.79	
D	下町地域	73	1.35			92	0.24		50	8.82	p<0.01	81	1.06	
E	地方都市	102	0.43			97	1.47		99	0.30		100	0.03	
F	会社役員・高級住宅地	80	4.86		p<0.05	102	0.09		103	0.20		96	0.37	
G	勤労者世帯	121	12.43		p<0.001	142	103.51		117	17.17	p<0.001	137	67.64	p<0.001
H	公園居住者	98	0.03			131	11.34		136	15.19	p<0.001	78	4.56	p<0.05
I	職住近接・工場町	233	72.88		p<0.001	98	0.03		135	10.08	p<0.001	119	2.55	
J	農村およびその周辺地域	68	20.03		p<0.001	67	43.20		75	25.92	p<0.001	69	32.67	p<0.001
K	過疎地域	51	21.08		p<0.001	45	53.91		81	6.64	p<0.05	57	27.73	p<0.001

B型

Type B		2004-2005			2005-2006			2006-2007			2007-2008			
Type	Description	Index	Chi-Square	Vd	P Value	Index	Chi-Square	P Value	Index	Chi-Square	P Value	Index	Chi-Square	P Value
B	入社数年の若手社員	0	0.39			-	-	-	0	0.26		-	-	-
C	大学とその周辺	116	0.19			-	-	-	43	1.47		-	-	-
D	下町地域	86	0.63			-	-	-	43	6.93		-	-	-
E	地方都市	103	1.59			-	-	-	102	0.46		-	-	-
F	会社役員・高級住宅地	85	4.78		p<0.05	-	-	-	65	17.32	p<0.001	-	-	-
G	勤労者世帯	114	10.67		p<0.01	-	-	-	130	30.75	p<0.001	-	-	-
H	公園居住者	117	3.01			-	-	-	58	11.98	p<0.001	-	-	-
I	職住近接・工場町	148	16.61		p<0.001	-	-	-	107	0.26		-	-	-
J	農村およびその周辺地域	78	16.67		p<0.001	-	-	-	82	7.85	p<0.01	-	-	-
K	過疎地域	60	25.27		p<0.001	-	-	-	107	0.57		-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 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：** インフルエンザウイルスの自然宿主は野生の水禽であり、ヒトと動物のすべてのインフルエンザウイルスの起源は、この野生水禽由来のウイルスである。よって鳥インフルエンザのサーベイランスはその制圧のための疫学情報のみならず、ヒトの新型ウイルスの出現予測のためにも有益な情報が得られる。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実施し、分離されたウイルスの遺伝子、抗原性および動物に対する病原性を明らかにし、インフルエンザの予防、診断および治療に役立てることを目的とする。2009年は日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取された渡りガモ、ハクチョウおよび家禽の材料4,674検体から合計82株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらの分離株の1つA/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)は、近年野生水禽から分離されている非病原性のH5ウイルスと遺伝的および抗原的に類似していた。さらに本ウイルスの鳥類に対する病原性を調べたところ、ウイルスはアヒル、ウズラに不顕性感染するが、ニワトリには感染しなかった。以上より、分離されたH5N1ウイルスは自然界で遺伝子再集合により生まれた非病原性ウイルスであることがわかった。本ウイルスを含む本年の分離株は当研究室のインフルエンザウイルスライブラリーに追加保存し、ヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に役立てている。

**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。ヒトを含む哺乳動物および鳥類のインフルエンザ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明らかになっている。これらのことから本研究では、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の抗原性、遺伝子性状および動物に対する病原性を明らかにし、ヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に役立てることを目的とする。

**B. 研究方法**

日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取した家禽、渡りガモおよびハク

チョウの材料4,674検体からウイルス分離を試みた。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定し、この亜型に基づいてウイルス株を系統保存に追加した。

マガモの糞便から分離されたA/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)の遺伝子解析を行い、各遺伝子分節の由来を明らかにした。また抗血清パネルを用いたHI試験により本ウイルスの抗原性を明らかにした。さらに、本ウイルスの鳥類に対する病原性を明らかにするために、アヒル、ウズラ、ニワトリに経鼻接種し、接種3日後の臓器中からのウイルス回収と接種14日後の抗体検出を試みた。

**C. 研究結果**

野鳥と家禽の糞便および気管ぬぐい液4,674検体から82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H1、H3、H4、H5、H6、H8、H9、H11、H12の9つの亜型に、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N5、N6、N8、N9の8つの亜型に区分された。HA遺伝子の解析の結果、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 (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加した。これにより、自然界から分離された65通りのウイルスに、79通りを実験室内作出株を加え、16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りすべてをライブラリーに系統保存した。これらのウイルスをヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に役立てている。

A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)のHA遺伝子の解析結果から、本ウイルスのHA遺伝子は、野生水禽から分離されている非病原性のH5ウイルスのそれと遺伝的に類似していた。またNA遺伝子は野生水禽から分離される非病原性のH1N1、H6N1およびH7N1ウイルスのN1遺伝子と高い相同性を示した。また、HI試験の成績から、本ウイルスのHAの抗原性は野生水禽から分離されている非病原性のH5ウイルスのそれと類似していた。さらに本ウイルスの鳥類に対する病原性を調べたところ、ウイルスはアヒル、ウズラに不顕性感染するが、ニワトリには感染しなかった。以上より、分離されたH5N1ウイルスは、野生水禽で受け継がれているインフルエンザAウイルスの遺伝子再集合により生まれたウイルスで、鳥類に対して非病原性のウイルスであることがわかった。

#### D. 考察

様々な亜型のインフルエンザAウイルスが野生水禽から分離された。これらの野生水禽ではインフルエンザウイルスの共感染が起こり、遺伝子再集合体が容易に生まれることがわかった。これらの様々な亜型のウイルスは、ヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に有用なバイオリソースとなる。

#### 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. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Itoh, Y., Ozaki, H., Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata, T., Soda, K., I soda N., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K., Nakayama, M., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2010). Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
- (2) Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimajima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., and Kawaoka, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
- (3) Kashima, Y., Ikeda, M., Itoh, Y., Sakoda, Y., Nagata, T., Miyake, T., Soda, K., Ozaki, H., Nakayama, M., Shibuya, H., Okamatsu, M., Ishigaki, H., Ishida, H., Sawai, T., Kawaoka, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Intranasal administration of a live non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: Comparison of formulations and administration routes of vaccines. *Vaccine* 27,

- 7402-7408.
- (4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H. (2009). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* 83, 1572-1578.
  - (5) Miyake, T., Soda, K., Itoh, Y., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Nagata, T., Ishida, H., Nakayama, M., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Amelioration of pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. *J Med Primatol* 39, 58-70.
  - (6) Moritoh, K., Yamauchi, H., Asano, A., Yoshii, K., Kariwa, H., Takashima, I., Isoda, N., Sakoda, Y., Kida, H., Sasaki, N., and Agui, T. (2009). Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, *Mx1* and *Oas1b*, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
  - (7) Sasaki, T., Isoda, N., Soda, K., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kokumai, N., Ohgitani, T., Imamura, T., Sawata, A., Lin, Z., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus. *Jpn J Vet Res* 56, 189-198.
  - (8) Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Sakamoto, R., Takikawa, N., Lin, Z., Okamatsu, M., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine* 27, 5174-5177.
  - (9) Simulundu, E., Mweene, A. S., Tomabechi, D., Hang'ombe, B. M., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009). Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154, 1517-1522.
  - (10) Tsuda, Y., Isoda, N., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on MDCK cells. *Virus Res* 140, 194-198.
  - (11) Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabechi, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009). Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 5, e1000350.
2. 学会発表
- (1) H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第13回日本ワクチン学会学術集会 (2009年、札幌)
  - (2) 「A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜」岡松正敏、山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
  - (3) 「不活化鳥インフルエンザVac-1 (H5N1) ワクチンは2008年に野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染発症を予防した」山本直樹、佐々木崇、岡松正敏、迫田義博、林志鋒、坂元隆一、西條加須江、国米則秀、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
  - (4) 「H9N2 インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか？」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学

会学術集会（2009年、東京）

- (5) 「H9インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会（2009年、東京）
- (6) 「H7高病原性鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性の解析」栗林沙弥、田中智久、迫田義博、坂部沙織、磯田典和、津田祥美、岡松正敏、梅村孝司、喜田宏第57回日本ウイルス学会学術集会（2009年、東京）
- (7) 「近年流行を起こしているH3N8馬インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」本島昌幸、岡松正敏、浅倉真吾、伊藤美加、前田友起子、福田奈穂、R. Sodnomdarjaa、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会（2009年、東京）

G. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

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

東南アジアにおけるインフルエンザ感染疫学 新型インフルエンザ対策  
「熱帯におけるライノウイルスの疫学」

研究分担者 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、古瀬祐気、藤直子（東北大学）

研究要旨

フィリピンタクロバンにおいて、重症肺炎患者から採取した咽頭拭い液 798 件よりライノウイルス C 型を 92 件、A 型を 116 検体、B 型を 25 検体検出したが、それぞれの季節性は異なっていた。ライノウイルス遺伝子に多様性があった事より、地域において複数の異なるウイルスが流行していたと考えられた。

A. 研究目的

ライノウイルスはウイルス性の呼吸器感染症で最も高率に検出されるウイルスの一つであり、急性呼吸器疾患で入院した 5 歳以下の子供における呼吸器疾患原因ウイルス第一位であると考えられている。近年新型であるライノウイルス C 型（分離不能）が発見された。しかし、小児呼吸器感染症におけるその正確な疫学像は明らかになっていない。本研究では、熱帯における C 型ライノウイルスの公衆衛生学的重要性を確認するため疫学的調査を行った

B. 研究方法

東北大学医学系研究科とフィリピン熱帯学研究所は、フィリピン・レイテ島、東ビサヤ地域医療センター（以下 EVRMC）にて小児重症肺炎の疫学調査を行っている。2008

年 5 月から 2009 年 4 月までに、EVRMC において重症呼吸器疾患と診断され入院した小児（生後 7 日から 14 歳）から採取した咽頭拭い液を検体とし、5 'Non-coding region を増幅する PCR にてスクリーニングを行った。陽性であったものについて、同領域および VP4 領域のシーケンス解析をおこないライノウイルス感染の遺伝型（A～C 型）を決定した。ライノウイルス陽性であった患者について、患者データをもとに遺伝型別の季節性を解析した。なお、本研究は、東北大学医学系研究科の倫理委員会の承諾のもと行っている。

C. 研究結果

2008 年 5 月から 2009 年 4 月までに採取した重症呼吸器疾患を呈した患者 798 件のうち 237 件（30%）でライノウイルス陽性

であり、そのうち 92 件 (39%) でライノウイルス C 型が検出された。A 型、B 型がそれぞれ 116 検体 (49%)、25 検体 (10%) であった。

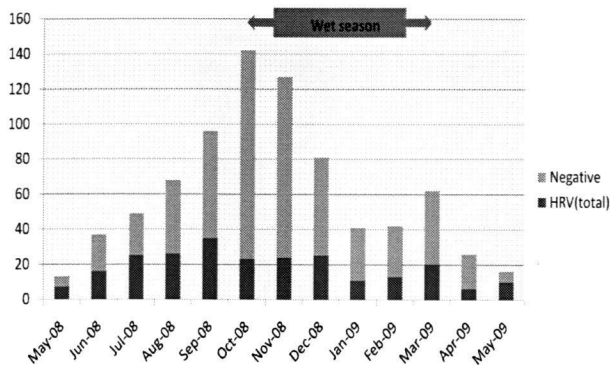


図 1 採取検体中に占める  
ライノウイルス陽性検体

フィリピンにおける重症呼吸器疾患のピ

ークは 9 ~ 11 月と 3 月に二度みられた。全ライノウイルス感染のピークは 7 ~ 11 月に観察され、続いて 3 月に小規模なピークがみられた。そのうち A 型は 7 ~ 9 月にピークがあり B 型では 9 月 ~ 11 月、C 型では 2 ~ 3 月に流行のピークが見られた。

全対象患者の平均年齢が 1.07 歳と、約 80% が 2 歳未満であった。A、B 型では 1 歳未満で多く検出 (全体の 61%) されたが、C 型で平均 1.3 歳とやや高い年齢層であった。

系統樹解析においては、同時期に採取されたにもかかわらず、遺伝子学的に多様性があることが確認された。

系統樹 (VP4 領域)

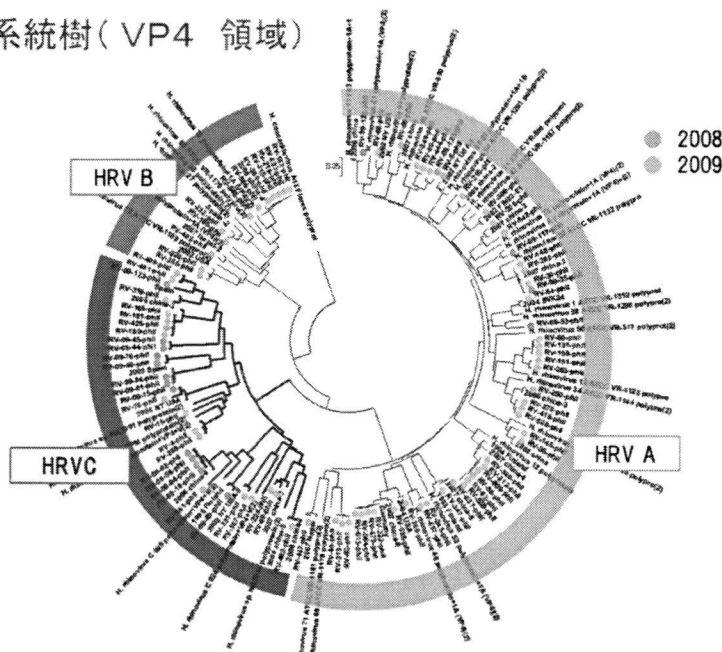


図 ライノウイルス VP4 領域での系統樹

#### D. 考察

小児呼吸器感染症患者の約30%からライノウイルスが検出された事より、本ウイルスの重要性が示唆された。また、フィリピンにおいてもライノウイルスC型の存在が確認され、A、B型とは異なる季節性を示すことが明らかになった。遺伝子学的解析より、非常に多様なライノウイルスがフィリピンに存在することを示した。

#### E. 結論

フィリピンの小児呼吸器感染症患者における、ライノウイルスの重要性を示した。今後、重症化との関連を解析する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①. Y Furuse, A Suzuki, M Kishi, H O Galang, S P Lupisan, R M Olveda, H Oshitani. Detection of novel respiratory viruses from influenza-like illness in the Philippines, Journal of Medical Virology, 2010 In press

##### ②. 学会発表

- フィリピンの小児におけるライノウイルスC型感染による重症呼吸器感染症の疫学調査、藤直子、東京、日本ウイルス学会、2009年10月

- High prevalence of rhinovirus C among children diagnosed as severe pneumonia in the Philippines, Naoko Fuji, Miami, 14<sup>th</sup> International Congress on Infectious Disease

#### 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

なし



## 百日咳流行株における定着因子 Prn の欠損とその欠損機構に関する研究

研究分担者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨 百日咳流行株には遺伝的な変化が認められており、わが国では定着因子 Prn を欠損する流行株の存在が確認されている。本研究では、わが国で臨床分離された百日咳菌 100 株 (1990~2009 年分離株) について、Prn 欠損株の流行状況ならびに Prn 欠損機構の検討を行った。その結果、Prn 欠損株はワクチン型 (*ptxA2/prn1*) の流行株に特徴的に認められること、さらに近年ではワクチン型の約 7 割を占めることが判明した。また、Prn 欠損原因を解析したところ、1) Prn シグナル配列の欠失、2) IS481 の *prn1* 構造遺伝子への挿入、という 2 種類の欠損機構が見出された。近年、Prn 欠損株の分離率が上昇傾向にあることから、Prn1 欠損はワクチン型百日咳菌の生存に有利に働いているものと考察された。

### 研究協力者

大塚菜緒 (国立感染症研究所 細菌第二部)

蒲地一成 (同上)

鱒坂裕美 (同上)

中村幸嗣 (同上)

齋藤良一 (同上)

### A. 研究目的

百日咳菌は種々の定着因子を産生し、その中でもパータクチン (Prn) は重要な定着因子の一つと考えられている。また、現行の DPT ワクチンの中には防御抗原として Prn を含有するものもあり、ワクチン抗原としての側面も持つ。近年、世界の百日咳菌流行株には百日咳毒素 S1 遺伝子 (*ptxA*) と *prn* 遺伝子に多様性 (抗原変異) が認められており、日本でも他の先進国と同様に流行株の遺伝子シフトが進行している。

我々は先の研究において、従来の流行株であるワクチン型 (*ptxA2/prn1*) に Prn タンパク質を欠損する株の存在を認めた。しかし、Prn 欠損株の出現理由はいまだ不明であり、Prn の欠損機構に関する詳細な解析が必要と考えられた。そこで、本研究

では Prn 欠損株の流行状況の把握とともに、その欠損機構について遺伝子解析を実施した。

### B. 研究方法

**菌株:** 1990~2009 年にわが国で臨床分離された百日咳菌 (100 株) を供試した。このうち、遺伝子型が *ptxA2/prn1* のワクチン型は 61 株、*ptxA1/prn1* の遷移型は 9 株、*ptxA1/prn2* の欧米型は 30 株であった。

**Prn 発現解析:** 菌体を SDS-lysis buffer に懸濁後、超音波処理により破菌させ全タンパク質を抽出した。タンパク質濃度は TCA-Lowry 法により測定した。全タンパク質 1 µg を 10% SDS-PAGE で分離した後、一次抗体 polyclonal mouse anti-Prn1 (1/500) および二次抗体 goat anti-mouse IgG-HRP (1/3000) を用いたイムノブロットを行った。化学発光は ECL detection (GE healthcare) を用いて行い、ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM) にて検出した。

**Sequence 解析:** *prn* 遺伝子の塩基配列は BigDye X Terminator purification kit を用いて PCR 増幅フラグメントを精製した後、ABI PRISM 3130xl

Genetic Analyzer により決定した。得られた塩基配列は SEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes Co.)を用いてアセンブリーを行った。PFGE 解析: 百日咳臨床分離株のうちワクチン型 61 株を対象とした。系統樹解析は、常法に従い genome DNA の制限酵素 *Xba*I 切断パターンにより行った。PFGE には CHEF Mapper system DR-III (BioRad)、バンドパターン解析には Fingerprinting II software (BioRad)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は分離菌株についての解析であり、ヒト由来の臨床材料を使用しない。また、菌が分離された患者の診療情報を扱わない。したがって、倫理上特段の問題点は発生しないと判断された。

### C. 結果

百日咳流行株における *Pm* 発現をイムノブロット法により解析したところ、ワクチン型に *Pm* 欠損株の存在を認めた (Fig. 1)。そこで、百日咳菌の遺伝子型と *Pm* タンパク質の発現を解析した結果、*Pm* 欠損株はワクチン型に特徴的な現象であることが判明した (Fig. 2)。*Pm* 欠損株の出現を年次的に見たところ、*Pm* 欠損株は 2000 年以降増加傾向を示し、さらに、2006~09 年ではワクチン型の約 7 割を占めることが判明した。

*Pm* 欠損株について遺伝子解析を実施したところ、2種類の *Pm* 欠損機構が見出された (Fig. 3)。一つは菌体表面への局在を担うシグナルペプチド (signal peptide: SP) の欠失であり、*prn* の 26~109 bp (84-bp) に欠失が認められた (Fig. 3A)。なお、この領域は SP の 28 アミノ酸 (Tyr<sup>9</sup>-Trp<sup>36</sup>) をコードするものであった。もう一つは *prn* 構造遺伝子への IS481 の挿入であった (Fig. 3B)。挿入配列である IS481 は *prn* 遺伝子上の 6-bp direct repeats (ACTAGG, 1593-1604 bp) に特異的に挿入されており、9 株の IS481 挿入株のうち 8 株は順方向、1 株は逆方向に挿入されていた。

次に、*Pm* 欠損株の地域的な出現状況を検討した (Fig. 4)。その結果、*Pm* 欠損株は 2000 年までは関東地方のみで分離されていたが、その後全国

的に分離地域が拡大したことが示された。なお、SP 欠失株は主に関東・東北地方で分離されたが、IS481 挿入株は関東以西で分離される傾向を示した。

*Pm* 欠損株を含むワクチン型百日咳菌について PFGE を実施し、その遺伝的相同性を解析した (Fig. 5)。クラスターを相同性 76% で分けた場合、SP 欠失株はクラスター B, G に分類され、21 株中 16 株がクラスター B に分離された。一方、IS481 挿入株はクラスター C, D, E に分類され、9 株中 4 株がクラスター D に分類された。このことから、IS481 挿入株と SP 欠失株は遺伝的に異なることが指摘された。

### D. 考察

わが国では定着因子 *Pm* を欠損する百日咳菌がワクチン型の流行株に特徴的に見出され、近年増加傾向にあることが示された。*Pm* 欠損株は 2000 年以降全国的に分離されており、2006~09 年ではワクチン型の約 7 割を占めるまで増加した。

*Pm* の欠損機構として、*Pm* のシグナル配列の欠失と IS481 の挿入が認められた。*Pm* のシグナル配列には hairpin 構造が存在し、この 10 bp の stem 部分がループ部分とともに切除されたものと推察された (Fig. 3C)。一方、百日咳菌東浜株のゲノム DNA には IS481 が 238 コピー存在し、臨床分離株でもゲノム中に多数存在することが知られている (50~200 コピー)。IS481 は 6-bp direct repeat 配列として NCTAGN を認識し、ゲノム DNA 中を動き回ることにより DNA の再編成と遺伝子破壊を担う。*prn* の構造遺伝子には IS481 の標的となる 6-bp direct repeat 配列 (ACTAGG) が存在し、この配列に IS481 が挿入されたことが *Pm* の欠損原因と考えられた。

現在まで *prn* の allele 遺伝子は 13 種類 (*prn1* ~ *prn13*) が報告されているが、*Pm* 欠損は *prn1* を有するワクチン型に特徴的な現象であった。ワクチン型の流行株は世界的に減少傾向にあるが、ワクチン型にとって *Pm1* 欠損はその生存に有利に働くことが示唆された。なお、シグナル配列における

hairpin 構造と 6-bp direct repeat 配列はワクチン型の *prn1* のみならず欧米型の *prn2* にも存在する。そのため、*prn* の遺伝子破壊株は今後欧米型でも出現する可能性は否定出来ない。本研究では2種類の欠損機構が同定されたことから、Pm1 欠損には何らかの選択圧が関与している可能性が指摘された。Pm はワクチンの防御抗原であること、さらに病原性フェージのレセプターを担うことから、ワクチンやフェージが Pm 欠損の選択圧となっている可能性がある。今後 Pm1 欠損に関わる選択圧の解明が必要である。

#### E. 結論

わが国の百日咳流行株に Pm 欠損株の流行を認めた。Pm 欠損はワクチン型の流行株に特徴的に認められ、その欠損機構にはシグナル配列の欠失と IS481 挿入が関与することが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表:なし
2. 学会発表:
  - 1) 大塚菜緒, 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村幸嗣, 齋藤良一, 荒川宜親. 百日咳菌における定着因子 Pm の欠損機構. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 21 年 3 月, 横浜(予定)
  - 2) 中村幸嗣, 蒲地一成, 豊泉裕美, 齋藤良一, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 岡田賢司, 加藤達夫, 荒川宜親. 成人と小児における百日咳保菌量の差異について. 第 84 回日本感染症学会総会, 平成 22 年 4 月, 京都(予定)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

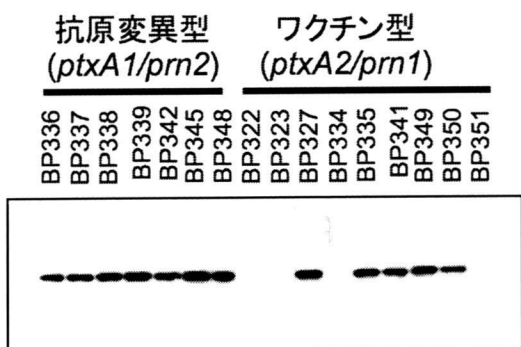


Fig. 1 欧米型(抗原変異型)とワクチン型百日咳菌におけるPmの発現  
全蛋白質 1 $\mu$ g/lane をイムノブロット解析に供試した

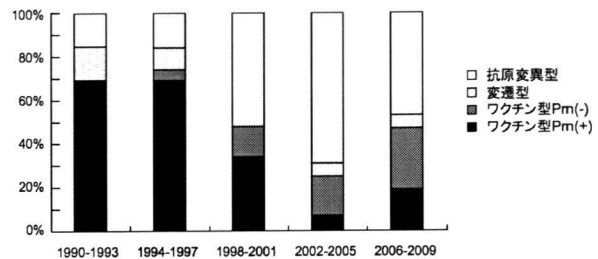


Fig. 2 百日咳臨床分離株におけるPm発現状況

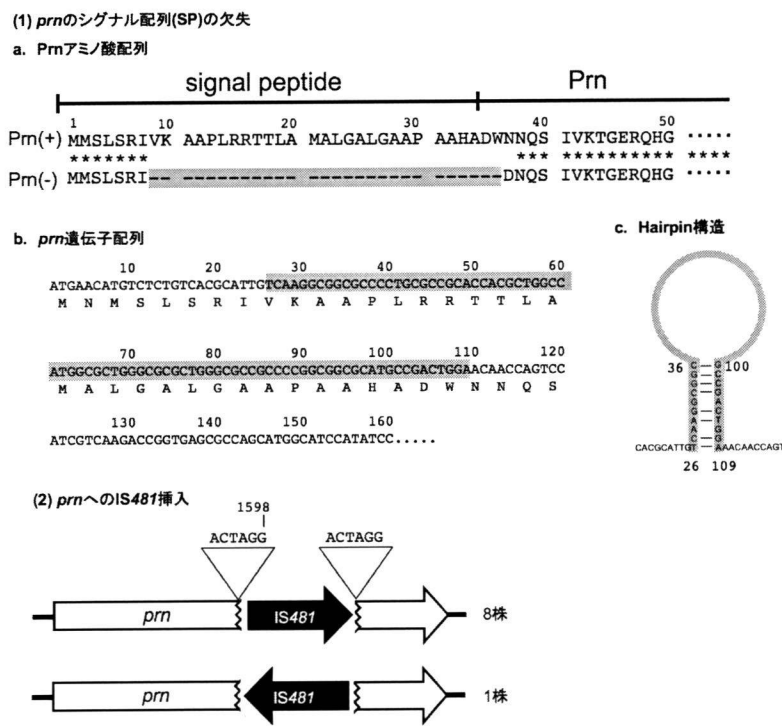


Fig. 3 Pmの欠損機構  
Pm欠損機構としてシグナル配列の欠失(1)とIS481の挿入(2)が認められた。シグナル配列に存在するヘアピン構造(C)。シグナル配列の欠失部位の配列を□で囲った