

(5 $\mu$ g/ml) or *Grifola frondosa* (5 $\mu$ g/ml)を添加し 6 日目に TNF- $\alpha$  を ELISA 法で測定した。

### C. 結果

*Phellinus linteus* 抽出液をアジュバントとした H5N1 経鼻ワクチンにより変異株による感染を防御した。

*Phellinus linteus*(PL)-アジュバント経鼻ワクチンによりワクチン株と同株のベトナム株及び変異株のインドネシア株に対する防御効果を調べた。ベトナム株由来ワクチンをワクチン単独または PL アジュバントと共に経鼻接種し最終免疫の 2 週間後にベトナム株及びインドネシア株を感染させた。血清中の抗体価及び鼻腔洗浄液中の抗体価を測定すると PL アジュバントを用いた場合の方がアジュバント無しと比較し有意に高い血中 IgG 抗体及び鼻腔洗浄液中の IgA 抗体価を示した。高い抗体価に呼応してベトナム株 1000pfu 感染に対して鼻腔洗浄液中のウイルス価は有意に減少した。コントロール群のマウスは 11 日までに死亡したが PL アジュバント併用経鼻ワクチン接種群では多くのマウスが感染 14 日以上生存し臨床症状を示さなかった。ワクチン株とは異なる株による攻撃感染を行ったインドネシア株による感染の場合も同様に PL アジュバント併用経鼻ワクチンはコントロールのアジュバント無しの場合と比較し鼻腔洗浄液中のウイルス価を有意に減少させ、感染後 14 日以上生存した。

キノコ熱性抽出アジュバント併用経鼻ワクチンの全身性 T 細胞応答は弱い

キノコ抽出物アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの T 細胞応答誘導を調べる目的でワクチン接種後の脾臓、頸部リンパ節の T 細胞を採取し抗原特異的インターフェロ $\gamma$  産生能を調べた。(図 1)

1). 最終免疫 7 日目のマウスより脾臓及び頸部リン

パ節から T 細胞を採取し抗原提示細胞と A/PR8 vaccine at 0.1, 1.0 or 10  $\mu$ g/ml と共に共培養した。PL アジュバントと共に免疫されたマウスでは少ないながらも有意なインターフェロ $\gamma$  が誘導された。(図 1 A). しかし *Macrolepiota gracilentia*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edode* mycelial アジュバントと共に免疫したマウスではほとんどインターフェロ $\gamma$  応答が見られなかった。同様に PL アジュバント併用ワクチン接種のマウスの頸部リンパ節 T 細胞では少ない応答がみられた。コレラの結果はキノコ抽出アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンによる全身性の T 細胞応答は比較的弱い事がわかった。

キノコ抽出アジュバントのサイトカイン誘導の MyD88 の関与

粗精製のキノコ熱性抽出物にはプロテオグリカンやヘミセルラーゼ、ベータグルカン等が含まれており CD14/TLR4 や dectin-1 を介して自然免疫を活性化することが知られている。MyD88 は Toll/IL-1R ファミリーのアダプター分子として知られている。そこでキノコ熱性抽出アジュバントによるサイトカイン誘導能を野生型マウスと MyD88 欠損マウスで調べた。野生株マウスおよび MyD88 欠損マウスの骨髄由来樹状細胞に lipopolysaccharide, Zymosan, 又はキノコ熱性抽出アジュバントを添加し 24 時間後の TNF- $\alpha$  の産生能を調べた。Zymosan, *Phellinus linteus*, *Macrolepiota gracilentia*, *Grifola frondosa* 又は *Lentinula edode* 抽出液を添加した時に TNF- $\alpha$  の産生は MyD88 欠損マウスの樹状細胞で部分的ではあるが有意に減少した。一方 LPS を添加した樹状細胞においては野生株と比較し MyD88 欠損マウスでは劇的に TNF- $\alpha$  産生が減少した。(図 2). 全てのキノコ熱性抽出アジュバントは LPS や zymosan 同様に TNF- $\alpha$  や IL-6 を誘導したが

IL-12 や p70 は誘導しなかった。

更に LPS と Zymosan は樹状細胞の CD40 発現を強く誘導したが *Phellinus linteus*, *Macrolepiota gracilentia*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edode* 由来の抽出物は樹状細胞に若干 CD40 の発現を誘導したのみだった。これらの結果からキノコ抽出物アジュバントによる炎症性サイトカインの誘導は分子メカニズムとして部分的に MyD88 依存的である事がしめされた。

#### D. 考察

致死率の高い新型インフルエンザになりうる可能性のある高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の感染予防を目指し、天然物由来物質による自然免疫の誘導を応用したアジュバント併用経鼻ワクチンによる感染防御の研究を行った。キノコ熱性抽出物である PL をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 IgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導され交叉防御能が確認された。本ワクチンによる全身性の T 細胞応答を調べたが T 細胞応答は高いものではなかった。よって本ワクチンによって得られる防御効果は主に血中の中和抗体である IgG 抗体及び粘膜上に誘導される IgA 抗体によるものが大きいと考えられる。また PL アジュバントの効果のメカニズムについてアダプター分子である MyD88 が部分的に関与している事が明らかとなった。

#### E. 結論

キノコ熱性抽出物 PL を粘膜アジュバントに用い高い交叉防御能のある新しいインフルエンザワクチン接種法が示された。本ワクチンによる感染防御メカニズムには PL によって MyD88 を介したサイトカイン誘導が関与している事が明らかとなった。ワクチンの経鼻投与による粘膜免疫

誘導が特に株の予測が困難な新型インフルエンザ対策としてその交叉防御の観点から有効である事が示された。また天然物由来のアジュバントを用いる事により安全性に優れたワクチン開発への応用が期待される。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai 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, Ainai 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

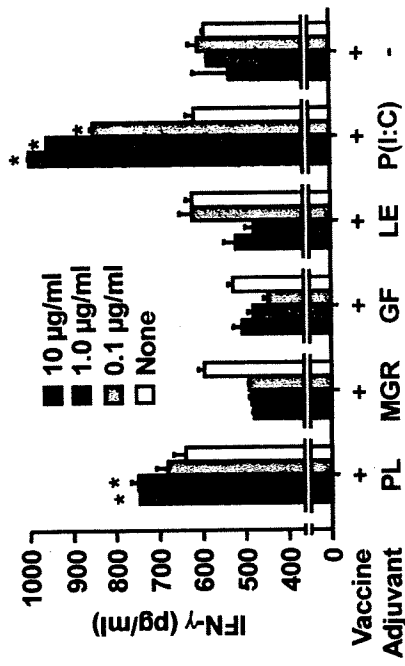
- mycelia. J Med Virol. 82:128-137, 2010.
5. Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. J Med Virol. 2010 Mar;82(3):476-84.
  6. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):8-15.
  7. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):67-71.
  8. Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, Hasegawa H, Takagi T, Nishihara H, Sata T, Tanaka S. Sudden Death of a Patient with Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection by Acute Respiratory Distress Syndrome. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):72-4.
- ト活性の亢進 第13回日本ワクチン学会学術集会 2009年9月札幌
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 2009年9月札幌
  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 2009年10月東京
  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 2009年10月東京
  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 2009年10月東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

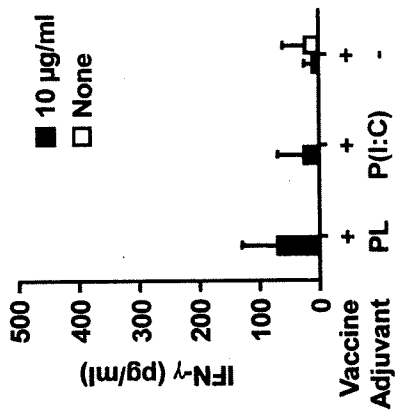
2. 学会発表
  1. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおける Zymosan 添加によるアジュバント
1. 特許取得（出願）
  - なし
2. 実用新案登録
  - なし

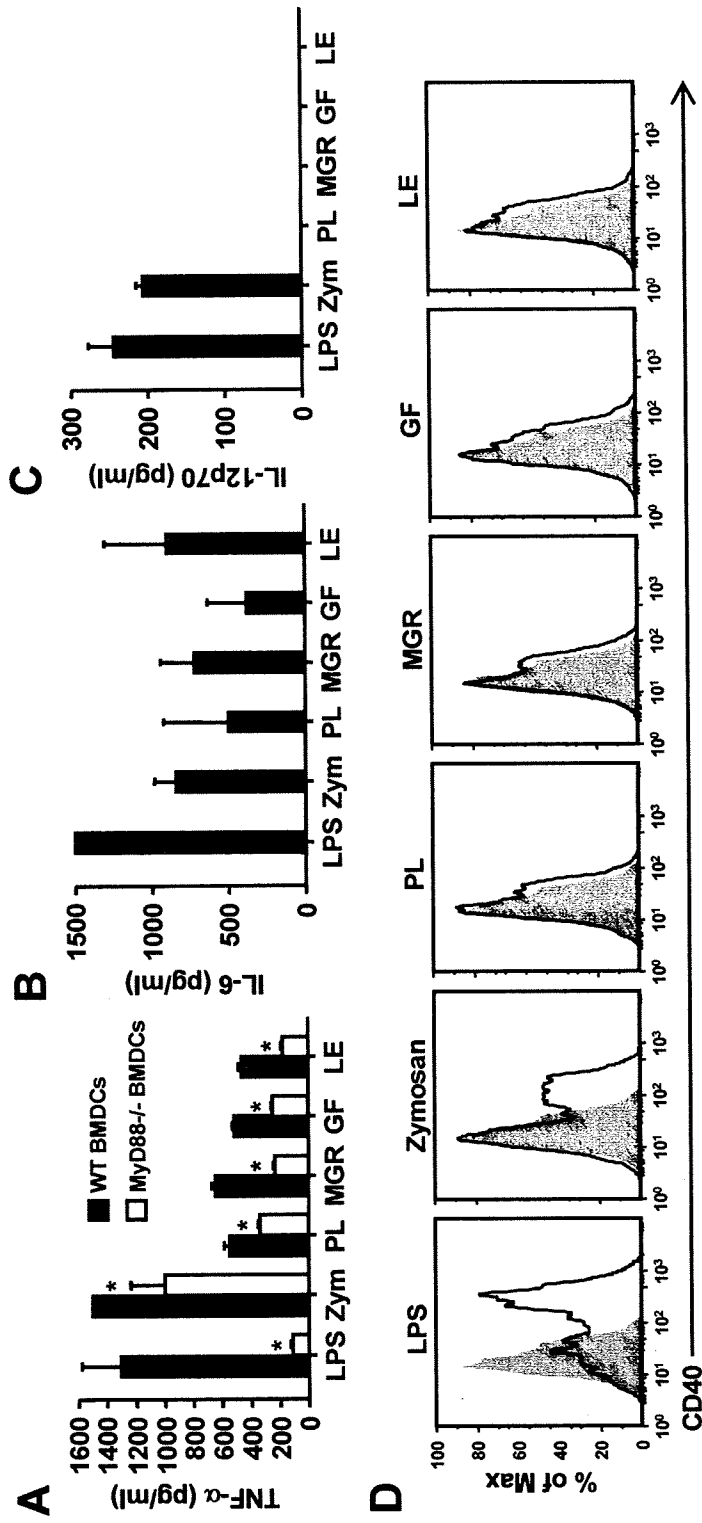
图 1

### A. spleen



### B. cervical lymph node





厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

海外における季節性インフルエンザウイルスにおけるノイラミニダーゼ耐性株出現頻度の解析と新規  
ザナミビル耐性株の発見

研究分担者 西藤岳彦（独）動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム  
研究協力者 内田裕子（独）動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム  
齋藤玲子、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学分野

**研究要旨** 2005年以降、世界的に薬剤耐性株の大流行がみられ、大きな問題となっている。

我々は、2007-2009年に海外で採取された季節性インフルエンザ株を用いて薬剤耐性頻度を調査した。

1) 2007-08年、ミャンマーで採取されたインフルエンザ A/H3N2 株 275 株中 2 株からザナミビルとアマンタジンの二重耐性株が見つかった。ザナミビル耐性に関連する NA 遺伝子に 136 位 Gln → Lys 変異をもち、IC50 値は感受性株の 30-60 倍に上昇していた。これは、世界で初のザナミビルとアマンタジンの二重耐性 H3N2 である。

2) 2008-09年にレバノン、ヴェトナム、ロシア（ウラジオストク）においてノイラミニダーゼ阻害剤耐性頻度を調査したところ H1N1 は、71.8%がオセルタミビル耐性であったが、国により頻度に差がみられた。

#### A. 研究目的

2005年以降アマンタジン耐性インフルエンザ株が、2008年以降オセルタミビル耐性 H1N1 株が、世界的に大流行を起こし大きな問題となっている。

我々は、過去数年間に、ミャンマー、ベトナム、レバノン、ロシアなどで海外で採取されたヒトの季節性インフルエンザ株について、ノイラミニダーゼ阻害剤耐性頻度を調査した。さらに、これまでにない NA 変異による耐性株が見つかった場合にはウイルス学的手法を用いて確認を行った。

#### B. 研究方法

海外の医療機関と協力しインフルエンザ検体を採取し、ウイルス培養株を用いてノイラミニダーゼ阻害剤耐性を検索した。

(1) 海外(ミャンマー、ベトナム、レバノン、

ロシア)の医療機関を受診したインフルエンザ様疾患患者から咽頭・鼻腔ぬぐい検体を採取した。

(2) MDCK 細胞を用いてウイルス培養を行った。

(3) 分離されたウイルス株を HAI 試験にて型別同定を行った。

(4) 分離株から、遺伝子シーケンスまたは、NA 遺伝子の特定の変異部位をターゲットとしたサイクリングプローブ法 (H1N1-H274Y 変異) によりノイラミニダーゼ阻害剤変異を検出した。

(3) 平行して、ノイラミニダーゼ阻害試験 (IC50) によりオセルタミビル、ザナミビルに対する阻止濃度を測定し、薬剤耐性株を検出する。

(4) これまで報告のない NA 変異による薬剤耐性株を検出した場合

① HA 遺伝子をはじめとして、アマンタジン耐性に寄与する M2 遺伝子等、他の遺伝子にも同時に変異がないか遺伝子特徴を確認した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取や調査遂行にあたっては、検体採取を行うそれぞれの海外の医療施設が所属する倫理委員会に申請を行い、調査の許可を得ているため倫理的に問題ない。

### C. 研究結果

#### 1. 2007-2008年ミャンマーH3N2株解析

2007-2008年にミャンマー国内で採取されたインフルエンザ H3N2 株 275 件について、NA 遺伝子のシーケンスを行ったところ、2 件 (0.7%) に NA 遺伝子 136 位 Gln→Lys 変異がみられた。1 件は 2007 年 8 月に、もう 1 件は 2008 年 7 月に採取されており、ノイラミニダーゼ阻害試験を行ったところ、ザナミビルに対してそれぞれ、IC<sub>50</sub> は 59.7nM, 33.4nM であった (Table 1)。同時期に採取された H3N2 株に比して阻止濃度が 30-60 倍上昇しておりザナミビル耐性株であると考えられた。オセルタミビルに対して阻止濃度上昇はなかった。なお、表中の IC<sub>50</sub> 値は、変異株とコントロール株については一株について 4 回以上ノイラミニダーゼ阻害試験を行っているため、平均値と標準偏差を示した。これら NA 変異株に M2 遺伝子のシーケンスを行ったところ、二株とも 31 位遺伝子に Ser→Asn 変異を持つアマンタジン耐性株であり、ザナミビルとアマンタジンの二重耐性株であることが判明した。

今回調査を行った 2007-08 年ミャンマーの H3N2 は、二重耐性株を含め、M2 遺伝子 31 位に Ser→Asn 変異を持つ、全てアマンタジン耐性株であった。さらに、HA 遺伝子解析を行ったところ、二重耐性株はそれぞれ、2007 年、2008 年に流行した H3N2 と同一のグループに属しており、二重耐性株のみでのクラスター形成は見られなかった (Figure 1)。

なお、今回の NA 遺伝子の Q136K 変異株に関しては、二株ともオリジナルの咽頭ぬぐい液も、MDCK にて 2 回継代した培養検体についても、同様に Q136 (Wild, CAA) と、K136 (Mutant, AAA) が混在していた (Figure 2)。しかし、K136 (Mutant)

優位のシーケンスクロマトグラムを呈していたため、ウイルスポピュレーション中も K136 が優位であると考えられる。今後、リバーシジェネティクスにより薬剤耐性の確認や、クローニング等で確認予定である。

#### 2. 2008-09年

2008-09年シーズンに、レバノン、ヴェトナム、ロシア (ウラジオストク) で採取された季節性インフルエンザ A/H1N1 (39 件), H3N2 (40 件), B 型株 (4 件) 合計 83 件についてノイラミニダーゼ阻害剤の耐性について調査した。H1N1 は全体で見ると、28 件 (71.8%) が NA 遺伝子の H274Y 変異をもつオセルタミビル耐性であった (Table 2)。H274Y 変異 H1N1 株のオセルタミビルに対する IC<sub>50</sub> は 824.9 + 261.7nM であり、感受性株に比して約 400 倍の阻止濃度の上昇があった。ザナミビル耐性はみられなかった。また、H3N2, B 型にオセルタミビルやザナミビル耐性株はなかった。

国別頻度では、レバノンは H1N1 の 100% (3/3 株)、ヴェトナムは 67.7% (4/6 株) が、ロシア (ウラジオストク) は 70.0% (21/30 株) がオセルタミビル耐性株であり、国別の頻度にばらつきがあった。

### D. 考察

#### 1. ザナミビル・アマンタジン二重耐性 H3N2 株

抗インフルエンザ剤耐性インフルエンザの大流行は世界的に大きな問題である。アマンタジン、オセルタミビルの耐性株が近年大流行したことに続き、我々の M2 阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤の二重耐性株の報告は大きなインパクトを持つ。2009 年、オーストラリアと米国 CDC グループから、それぞれ相次いでザナミビル耐性 H1N1 (Q136K 変異) が報告された。我々の H3N2 と全く同じ NA の 136 位 Gln→Lys 変異をもつ H1N1 であったが、いずれもアマンタジンには感受性であった。このため、今回我々は世界で初めてザナミビルとアマンタジンの二重耐性株の H3N2 を見いだしたことになる。オーストラリアと米国の H1N1 の Q136K 変異株は、両報告ともオリジナルの咽頭

ぬぐい液からは、WildのQ136のみであり、MDCK細胞の培養後にはじめてK136変異が検出されていた。培養により変異株が選択される可能性が示唆された。しかし、我々のH3N2の二重耐性株は、K136変異(Mutant)は、MDCK培養後と同様に、オリジナルの臨床検体中にも存在した。このため、少なくともH3N2においては、Q136K変異は、培養によって選択された結果ではないということが示された。しかしながら、Q136K変異株のザナミビルに対する阻止濃度は30-60倍の上昇であり、オセルタミビル耐性H274Y変異株の400倍に比べるとかなり低い。また、ザナミビルの用法は吸入のため、気道表面の濃度が非常に高くなることが予測される。このため、Q136K変異株が、臨床的にも耐性を呈するのか、疑問である。なお、オーストラリアとCDCの培養Q136K-H1N1株のIC50は、ザナミビルに対して30-300倍の上昇をみせており、我々のH3N2と似た結果であった。

ミャンマー国内では、インフルエンザの治療に抗インフルエンザ剤は全く使用されていない。しかし、今回のザナミビルとアマンタジンの二重耐性株をはじめとして、同シーズン中に採取されたH3N2は全てアマンタジン耐性株であった。このため、ミャンマー国内での薬剤使用には全く関連無く、薬剤耐性株がヒトからヒトへと伝播感染を起こしているものと考えられる。しかし、CDCやオーストラリアの報告においてもQ136K耐性株は、アジア、中央アメリカなど各地から散発的に採取されている。今回のザナミビル・アマンタジン二重耐性株が世界のどこかの国に由来するものなのか全く不明であるが、今後二重耐性を成立させる機序等ウイルス学的な検討が必要である。

## 2. 2008-09年オセルタミビル耐性頻度

2007-08年シーズンにヨーロッパに端を発したオセルタミビル耐性H1N1株は、次の2008-09年シーズンには、ほぼ全世界で大流行を起こした。特徴としてはすべてNA遺伝子の274位に耐性変異をもつことである。我々の調査より、日本では2008-09年はH1N1の全ての株がオセルタミビル耐

性であった。

今回は、同様の調査を2008-09年にレバノン、ロシア(ウラジオストク)、ヴェトナムで行った。レバノンは、ヨーロッパと同様にH3N2がメインの流行であったため、H1N1が3件しか採取できなかった。しかし、すべてIC50上昇とNA遺伝子274位の変異をもつオセルタミビル耐性株であり、ヨーロッパの流行の影響を強く受けていることが示唆された。一方で、アジア側のヴェトナムと、ロシア(ウラジオストク)は、オセルタミビル耐性頻度は7割程度であり、同じシーズンに日本では100%オセルタミビル耐性であったことと、差が生じていた。中国では、オセルタミビル感受性のH1N1が流行していたという情報もあり、近隣であっても、より人と人の交流が多い地域の影響を受けやすいと考えられる。インフルエンザの伝播経路については、H3N2はアジア起源であると言われているが、H1N1やB型については不明である。今後はH274YやアマンタジンのS31N変異、あるいは新型インフルエンザH1N1をマーカーとして、世界的な伝播経路解析が進むものと考えられる。

## E. 結論

2007-08年、ミャンマーで採取されたインフルエンザA/H3N2株からザナミビルとアマンタジンの二重耐性株が見つかった。2008-09年にレバノン、ヴェトナム、ロシア(ウラジオストク)において調査したところオセルタミビル耐性H1N1の頻度は71.8%であったが、国による頻度に差がみられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Clyde Dapat, Yasushi Suzuki, Reiko Saito, Yadanar Kyaw, Yi Yi Myint, Nay Lin, Htun Naing Oo, Khin Yi Oo, Ne Win, Makoto Naito, Go Hasegawa, Isolde C. Dapat, Hassan Zaraket, Tatiana Baranovich, Makoto Nishikawa, Takehiko Saito, and Hiroshi Suzuki. Rare Influenza A (H3N2) Variants with Reduced



Sensitivity to Amantadine and Zanamivir.  
Emerging Infectious Diseases 2009

## 2. 学会発表

1. 鈴木康司、齋藤玲子、西藤岳彦、ザラケット・ハッサン、小熊妙子、バラノビッチ・タチアナ、川島崇、佐藤勇、日比成美、生嶋聡、藤原史博、橋田哲夫、真崎宏則、星野和彦、麻生憲史、出川聡、川上千春、鈴木宏. 本邦6地域におけるオセルタミビル耐性 H275Y 変異 A/H1N1 インフルエンザウイルス発生頻度. 第83回日本感染症学会総会. 2009年4月23-24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  
なし

Table 1. Characteristics of subtype H3N2 viruses with Q136K mutation in NA and S31N substitution in M2

Strains	Passage history	NA mutation	IC <sub>50</sub> s of NA Inhibitors (nM)				Amantadine sensitivity‡ (M2 mutation)
			Zanamivir	Fold change	Oseltamivir	Fold change	
All NAI-sensitive H3N2 viruses*	MDCK 2	None	1.12 ± 0.40	1	0.86 ± 0.44	1	Resistant (S31N)
A/Myanmar/M187/2007	MDCK 2	Q136K	59.72 ± 3.83	53.3	0.13 ± 0.05	0.2	Resistant (S31N)
A/Myanmar/M114/2008	MDCK 2	Q136K	33.37 ± 7.02	29.8	0.16 ± 0.03	0.2	Resistant (S31N)
A/Texas/131/2002†		None	1.43 ± 0.09	1.3	0.99 ± 0.09	1.2	Sensitive
A/Texas/131/2002_E119V†		E119V	5.43 ± 0.68	4.8	94.33 ± 2.06	109.7	Sensitive

\*Average IC<sub>50</sub> was calculated excluding the control viruses (n=47).

†Reference strains used as drug-sensitive and resistant control viruses in the NAI assay.

‡Amantadine sensitivity was based on M2 genotyping data

**Table.2** IC<sub>50</sub> values in NA inhibition test with oseltamivir and zanamivir of influenza viruses isolated in three regions (Lebanon, Vietnam, and Russia)

Type/subtype	n	Oseltamivir IC <sub>50</sub> (nM)	Zanamivir IC <sub>50</sub> (nM)
A/H1N1	11	1.99 ± 0.58	1.55 ± 0.48
A/H1N1 [H275Y]	28	824.9 ± 261.7	1.58 ± 0.46
A/H3N2	40	1.33 ± 0.53	0.77 ± 0.61
B	4	50.1 ± 10.5	63 ± 29.4

HA

NA



Figure 1. Phylogenetic analysis of the HA and NA genes of influenza virus A (H3N2) isolates in Myanmar in 2007 and 2008.

Amantadine-resistant isolates with S31N mutation in M2 are marked with asterisk(\*) and isolates with reduced sensitivity to zanamivir with Q136K mutation in NA are marked with squares (■).

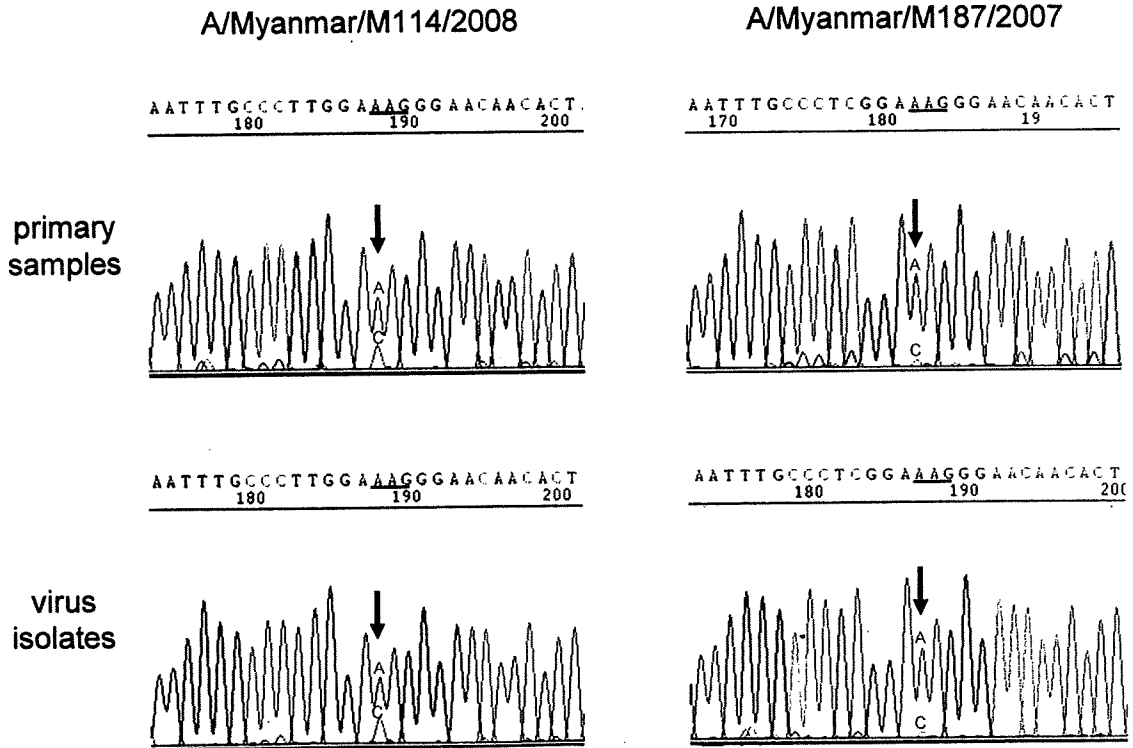


Figure 2. Detection of Q136K substitution in NA by sequencing in primary samples and virus isolates.

分担研究報告書

新型インフルエンザ検査診断系の緊急構築とその改良に関する研究

分担研究者	小田切孝人	国立感染研究所・インフルエンザウイルス研究センター第一室	室長
協力研究者	影山 努	国立感染研究所・同第二室	室長
	中内美名	国立感染研究所・同第二室	研究員
	岸田典子	国立感染研究所・同第一室	研究員
	白倉雅之	国立感染研究所・同第四室	研究員
	板村繁之	国立感染研究所・同第三室	室長
	小淵正次	国立感染研究所・同第一室	主任研究官
	氏家 誠	国立感染研究所・同第一室	主任研究官

**研究要旨** 2009年4月以降、ブタ由来のA/H1N1インフルエンザウイルス(新型A/H1N1pdmウイルス)のヒトへの感染例が相次いで報告され、その後、世界中に拡大して世界規模の大流行(パンデミック)を引き起こした。

本研究では、新型A/H1N1pdmウイルスが本邦に上陸する前に、PCRを用いた新型A/H1N1pdmウイルスの感染診断検査系を直ちに構築し、検疫所、地方衛生研究所においても新型A/H1N1pdmウイルスの感染診断が実施できる体制の構築を行った。その結果、新型A/H1N1pdmウイルスの国内流行状況をタイムリーに把握する事が可能となり、我が国の新型A/H1N1pdmウイルスによるパンデミック対策に大きく貢献する事ができた。また、今回構築した検出系は、WHOのPCR-WGとも共有し、国外の検査機関での診断検査系の開発にも役立てられた。

**A. 研究目的**

2009年4月に米国、メキシコ、カナダにおいて、ブタ由来のA/H1N1インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が相次いで報告された。以降このウイルス(新型A/H1N1pdmウイルス)は世界中に拡大し、世界規模の大流行(パンデミック)を引き起こした。

本研究では、新型A/H1N1pdmウイルスが本邦に上陸する前に、PCRを用いた感染診断検査系を直ちに構築し、検疫所、地方衛生研究所に検査マニュアル、検査試薬の配備を行い、全国的に新型A/H1N1pdmウイルスへ感染診断が実施できる体制を構築する事を目的とする。

**B. 研究方法**

4月24日、米国カリフォルニア州の患者検体より分離された新型A/H1N1pdmウイルス(カリフォ

ルニア株)の遺伝子配列が公開された。この配列を元にして、新型A/H1N1pdmウイルスのみを特異的に検出する検査系の構築に取り組んだ。H1亜型のブタインフルエンザウイルスには、北米およびユーラシアの2系統の古典的ブタインフルエンザウイルスが知られている。また、鳥で循環しているH1亜型インフルエンザウイルスやヒトで流行している季節性のA/ソ連型(H1N1)ウイルスも存在し、H1亜型は、ブタ北米系統、ブタユーラシア系統、鳥北米系統、ヒト季節性と大きく四つに分ける事ができる(図1)。新型A/H1N1pdmウイルス(カリフォルニア株)は、HA遺伝子の系統樹解析の結果ブタ北米系統に分類された。そこで季節性のA/ソ連型(H1N1)ウイルス、A/香港型(H3N2)には交差せず、北米系統のブタインフルエンザウイルスのHA遺伝子のみをコンベンショナルRT-PCR法もしくはTaqManプローブを用いたリアルタイム

RT-PCR 法により検出できるように、いくつかのプライマーおよびプローブの設計を行った。

### C. 研究結果

4月28日に設計したプライマーおよびプローブが納入され、同日および翌日にかけて、ブタインフルエンザウイルスとの特異性・検出感度の検証、季節性ヒトインフルエンザウイルスとの交差反応性についてそれぞれの方法で検証を行った。この時点ではまだ、カリフォルニア株は入手できておらず、反応条件の検討や検出感度の検証は北米系統のブタインフルエンザウイルス(H1N2)株を用いた。その結果、高感度かつ特異的に北米系統のブタインフルエンザウイルスの H1 HA 遺伝子を検出可能なコンベンショナル RT-PCR 用のプライマーおよびリアルタイム RT-PCR 用のプライマー、プローブの組み合わせを確認することができた。配列および反応条件は図2、表1および表2に示した。

4月30日に、RT-PCR 法用のプライマー、リアルタイム RT-PCR 法用のプライマーとプローブ、そしてリアルタイム RT-PCR 法に必要な試薬を、全国の75カ所の地方衛生研究所(地衛研)および15カ所の検疫所に発送するように、メーカー(ライフテクノロジーズジャパン株式会社および株式会社キアゲン)に発注し、これらの試薬類は5月2日頃までに全ての地衛研、検疫所に到着した。また、新型インフルエンザウイルス診断マニュアル、検査フローチャート、検体を感染研に送付する際に必要な検体情報入力フォーマットシートを作成し、5月1日に感染症情報センターおよび厚生労働省食品全部企画情報課検疫所業務管理室を通じて地衛研および検疫所に配布した。検査に必要な陽性コントロール(この時点でもまだカリフォルニア株の入手ができていなかったため北米系統のブタインフルエンザウイルス(H1N2)株から抽出したRNA)も、同日インフルエンザウイルス研究センターから発送した。なお、5月2日にカリフォルニア株を米国CDCから入手する事ができ、この株を用いて今回構築した検出系の検証を行った結果、検出感度および特異性には問題なく、季節性のA/ソ連型H1N1ウイルスを明確に区別し、新型A/H1N1pdmウイルスのみを特異的に検出できる検査系である事が確認された。

5月4日までには地衛研および検疫所における

検査体制が整い、新型A/H1N1pdmウイルスの全国的な検査体制が整った。海外帰国者でインフルエンザ様症状を訴えた患者を中心にスクリーニングが行われ、5月8日には成田空港検疫所においてカナダからの帰国者より、新型A/H1N1pdmウイルスが検出された。検体は直ちに感染研に搬入され、翌日未明までに確認検査を行った結果、新型A/H1N1pdmウイルスである事が確認された(輸入感染初発例)。5月15日には神戸市環境保健研究所で新型A/H1N1pdmウイルスが検出され、翌日中に感染研でも確認検査を行い、新型A/H1N1pdmウイルスである事が確認された(国内感染初発例)。本検出系による陽性例の反応パターンを図3および図4に示した。

### D. 考察

これまでに検疫所および地衛研に対して、高病原性鳥インフルエンザH5N1の実験室診断法についての研修会およびトレーニングコースを開催していたため、緊急事態にも関わらず、地衛研および検疫所において5月4日までに新型A/H1N1pdmウイルスの検査体制を整える事ができた。これにより、全国的な検査体制ができあがり、新型A/H1N1pdmウイルスの国内流行状況をタイムリーに把握する事が可能となり、我が国の新型A/H1N1pdmウイルスによるパンデミック対策に大きく寄与する事ができた。また、今回構築した検出系は、WHOのPCR-Working Groupとも共有し、国外の検査機関での診断検査系の開発にも役立てられた(添付資料1: WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans)。また、海外からの検査依頼(表4)にも対応し、その検査結果は直に対象国へフィードバックした(表5)。

その後、新型A/H1N1pdmウイルスの国内への流行拡大に伴い、当初構築した検査系では検出しにくい変異株が出現した。このような変異株をも検出できるように、流行株の塩基配列解析を行い、リアルタイム RT-PCR 法用のプローブ配列を一部変更した(表3および図5)。10月20日に改良後のプローブおよびプライマー、検査マニュアルおよび陽性コントロールとして検体から分離した新型A/H1N1pdmウイルスより抽出したRNAを、75カ所の地方衛生研究所(地衛研)および15カ所の検疫所に向け発送し、全国の検査施設で変異株も

検出できる様に対応した。

## E. 結論

新型 A/H1N1pdm ウイルスの検査系の開発ならびに地衛研および検疫所での迅速な検査体制の構築により、本邦にウイルスが侵入する前に、全国規模での新型 A/H1N1pdm ウイルス診断体制を整える事ができ、我が国のパンデミック対策に大きく寄与する事ができた。変異株のモニタリングも適宜実施し、必要に応じてプライマー、プローブを更新し、常に高い検出精度を維持するように、診断検査系の改訂を適宜行う必要がある。このため検査機関との連携および情報交換が非常に重要となってくる。また、本研究で構築された検査系を用い検査体制が地衛研および検疫所において迅速かつスムーズに整える事ができたのは、研修会およびトレーニングコースの成果であったと考えられる。今回の様に緊急対応しなければならない場合や検査精度を維持するためには、研修会等による定期的なトレーニングが非常に重要と考えられる。

東南アジアでは未だ高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行が続いており、このウイルスを由来とする新型インフルエンザ出現の可能性が取りざたされている。今後、また出現するかもしれない新型インフルエンザの発生に備えて、新型インフルエンザになる可能性があるウイルス検出系の構築、鳥や動物インフルエンザウイルスのサーベイランスおよび連携機関との情報共有等の継続を図らなければならないと考えられる。本研究で得られた知見は、今後、新型インフルエンザが新たに発生した場合のパンデミック対策に大いに寄与すると考えられる。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. :Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 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., Aina, 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., Aina, 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

#### 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

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得   なし  
2. その他   なし

図1 H1 HA遺伝子の系統樹解析

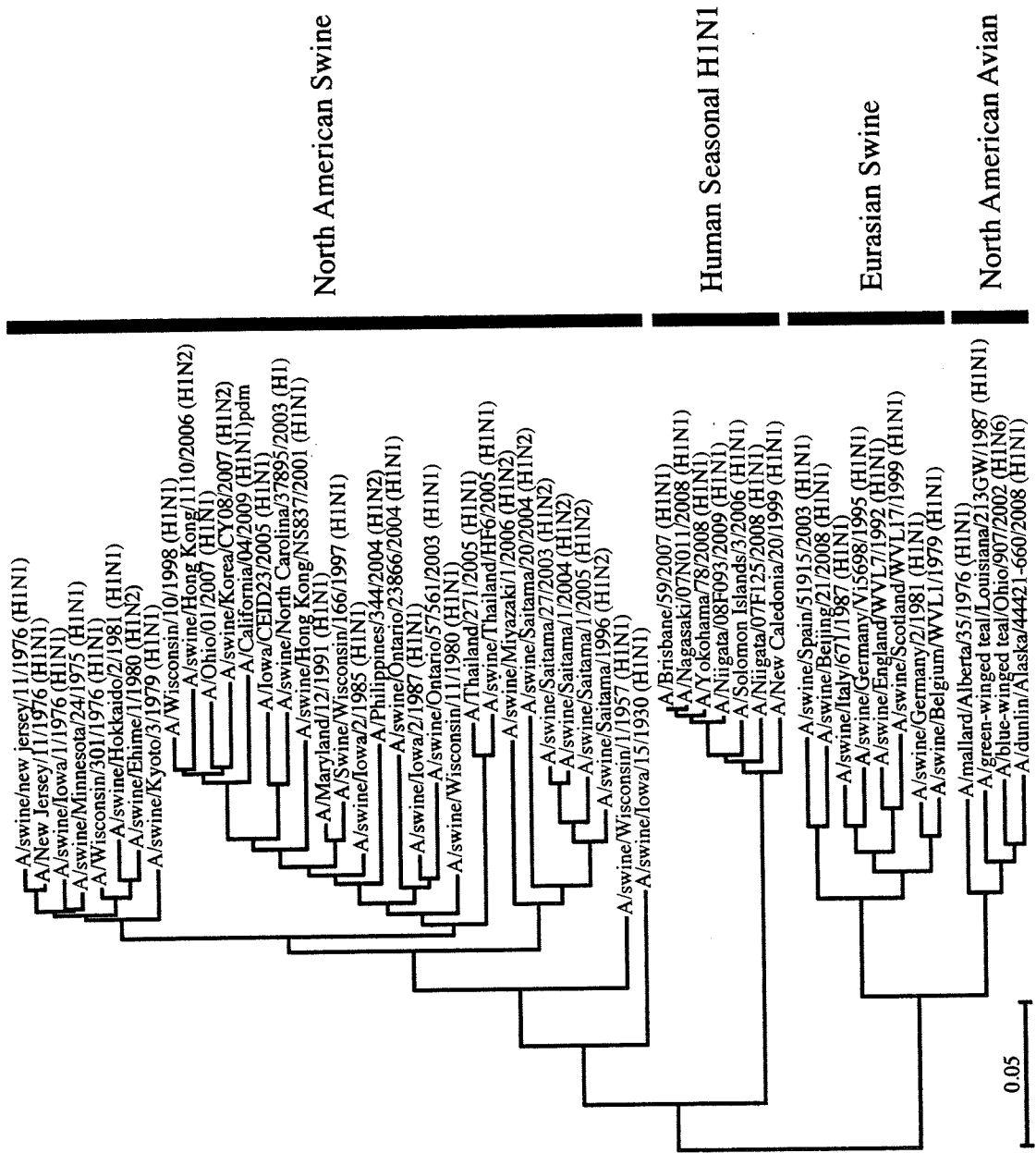




図2. A/H1N1pdm 検出用PrimerおよびProbeのデザイン

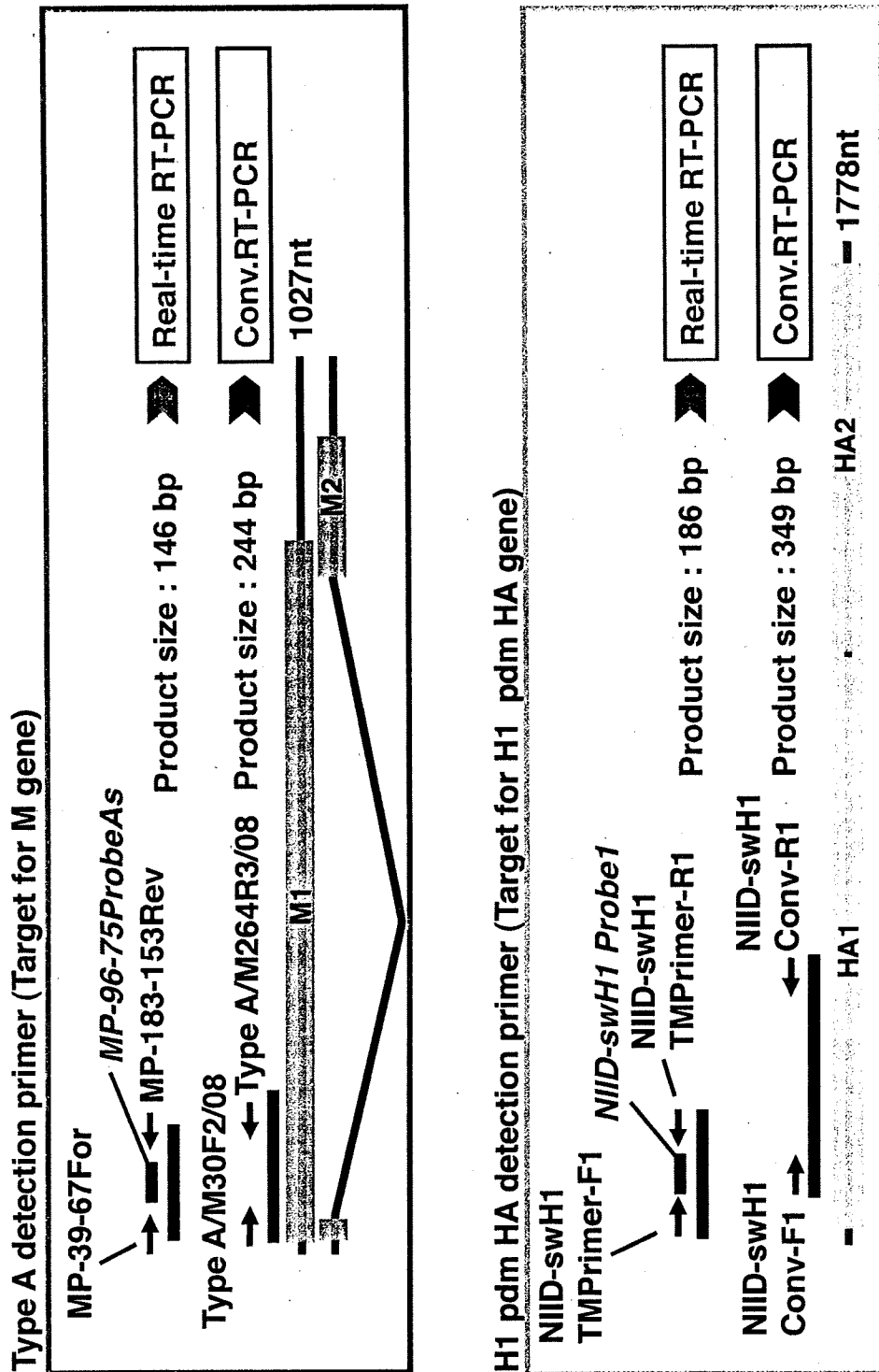


表1. A/H1N1pdm検出用 コンベンショナル RT-PCR Primer の配列と反応条件

Target	Name	Sequences	Category
Type A (M gene)	Type A/M30F2/08 Type A/M264R3/08	5'- ATGAGYCTTAAACCGAGGTCGAAACG-3' 5'- TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3'	Primer (+) Primer (-)
H1pdm	NIID-swH1 Conv-F1 NIID-swH1 Conv-R1	5'- TGCATTTGGGTAATGTAAACATTG -3' 5'- AATGTAGGATTTCTGAKCTTTGG-3'	Primer (+) Primer (-)

Reagent mix (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit)	
5 x OneStep RT-PCR Buffer	5.0µl
Sense (+) primer (10µM)	1.5µl
Antisense (-) primer (10µM)	1.5µl
dNTP混合液	1.0µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0µl
RNase inhibitor (20U/µl)	0.5µl
RNase free Water	9.5µl
RNA template	5.0µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25µl</b>

Thermal cycler conditions (ABI GeneAmp® PCR System 9700)	
50 °C 30 min.	
95 °C 15 min.	
94 °C 30 sec.	] x 45 cycles
50 °C 30 sec.	
72 °C 40 sec.	
72 °C 10 min.	

[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic\\_recommendations/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recommendations/en/index.html)に記載

表2. A/H1N1pdm検出用 Real-time RT-PCR Primer & Probe の配列と反応条件

Target	Name	Sequences	Category
Type A (M gene)	MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCCTCTATC-3'	Primer (+)
	MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAEC CAYTCCA-3'	Primer (-)
	MP-96-75ProbeAs	5'- (FAM) ATYTCGGCTTIGAGGGGGCCTG (MGB) -3'	Probe
H1pdm	NIID-swH1 TmPrimer-F1	5'- AGAAAAGAATGTAACAGTAAACACACTCTGT-3'	Primer (+)
	NIID-swH1 TmPrimer-R1	5'- TGTTCCACAATGTARGACCAT-3'	Primer (-)
	NIID-swH1 Probe1	5'- (FAM) CAATRTTRCATTACC(MGB) -3'	Probe

Thermal cycler conditions (Chromo-4)	
50 °C	30 min.
95 °C	15 min.
94 °C	15 sec.
54 °C	1min. (Data collection)
	x 45 cycles

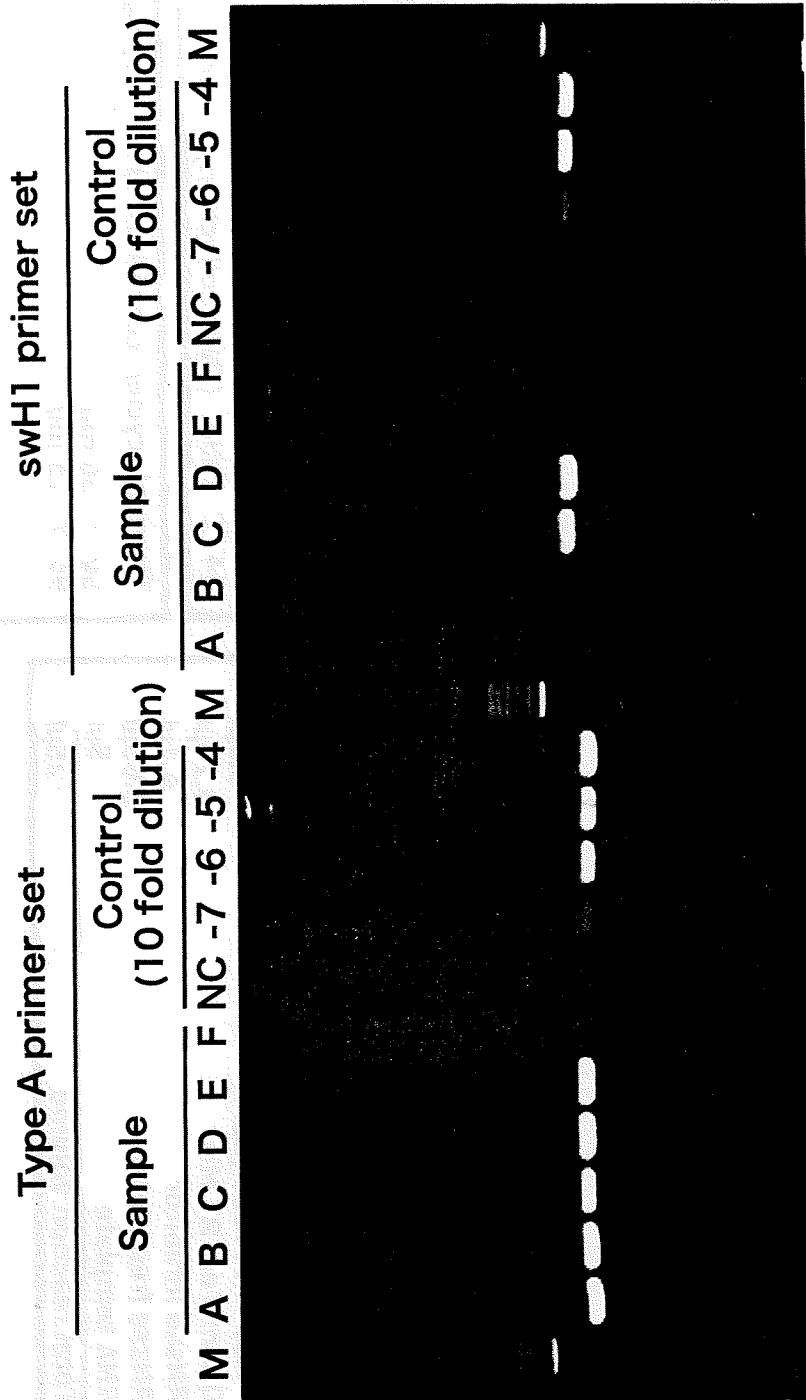
Thermal cycler conditions (ABI 7500 Fast)	
50 °C	30 min.
95 °C	15 min.
94 °C	15 sec.
54 °C	75 sec. (Data collection)
	x 45 cycles

Regent mix (QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR Kit)	
2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5µl
Sense (+) primer (10µM)	1.5µl
Antisense (-) primer (10µM)	1.5µl
*TaqMan Probe (5µM)	0.5µl
QuantiTect RT Mix	0.25µl
RNase inhibitor	0.1µl
RNase free Water	3.65µl
RNA template	5µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25µl</b>

[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic\\_recommendations/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recommendations/en/index.html)に記載

図3. RT-PCR実施例



Sample CおよびDが新型インフルエンザ(H1N1)pdm