

「新型インフルエンザの発生予測、早期検知、リスク評価および
大流行に対する事前準備と緊急対応に関する研究」

馬 II 型インフルエンザウイルスの NAI 感受性について

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 真瀬昌司 (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

2009 年 4 月に 2 種の豚インフルエンザウイルスの間の遺伝子再集合によって生じた Pandemic (H1N1) 2009 ウイルスが、香港風邪以来のパンデミックを引き起こした。パンデミックウイルスに対するワクチンの供給が可能となるまでの期間、ノイラミニダーゼ阻害剤がパンデミックウイルスによる重症化の防止に効果的であった。本研究では、これまでにヒトで出現したパンデミックウイルスの歴史や人とのかかわりの高さから、馬 II 型インフルエンザウイルス (H3N8) の次期パンデミックウイルスとしての可能性を考慮して、近年国内で馬から分離された H3N8 亜型ウイルスのノイラミニダーゼの阻害剤に対する感受性 (IC₅₀) を測定した。

A. 研究目的

2009 年 4 月に 2 種の豚インフルエンザウイルスの間の遺伝子再集合によって生じた Pandemic (H1N1) 2009 (パンデミック) ウイルスが、香港風邪以来のパンデミックを引き起こした。起因ウイルスのノイラミニダーゼ (NA) は、それ以前の季節性インフルエンザウイルスであるソ連風邪ウイルス (H1N1) と同じ亜型であり、また NA 阻害剤 (NAI) に対する耐性変異を持っていなかった。このため、ワクチンが利用可能となるまでの間、NAI はパンデミックウイルスによる重症化を防ぐのに効果を発揮したと考

えられた。

これまでの NAI に対する耐性機序の解析、耐性変異の同定は主に季節性インフルエンザウイルスの持つ N1 亜型および N2 亜型、B 型 NA に関して行われてきた。一方で、新型インフルエンザウイルス候補としては、すべての NA 亜型が考えられることから、N1 亜型および N2 亜型以外の NA に関して NAI に対する感受性や耐性変異獲得機序を解析することは、新型ウイルス発生によるリスク評価や、重症化を阻止するためには重要な課題である。

H3N8 亜型のウイルスは、1963 年以降馬の

中で馬 II 型インフルエンザウイルスとして、循環を続けており、国内においても過去数回の馬インフルエンザを引き起こしている。一方、血清考古学的な手法による解析によって、1900 年のパンデミックおよび 1800 年代後期のパンデミックの起因ウイルスが、H3N8 亜型ウイルスであると考えられている。馬はかつて重要な輸送手段として、人間生活に密接にかかわっており、また近年では競馬、乗馬などを通して生活に関与していることから、馬から人へのウイルス伝播が起こる可能性は否定できない。海外では、競走馬から競争犬への H3N8 亜型ウイルスの伝播が報告されている。このため、本課題では国内で 2007 年から 2008 年に起こった競走馬を中心とした馬インフルエンザ発生に由来する H3N8 亜型ウイルスの NAI に対する感受性を蛍光基質法を用いて解析した。

B. 研究方法

(1) 2007 年から 2008 年にかけて、国内で発生した馬インフルエンザ起因ウイルス (H3N8 亜型) 13 株について、NA 遺伝子の塩基配列を決定した。馬 II 型インフルエンザウイルスのプロトタイプである A/Equine/Miami/63 (Eq/Miami/63) の NA 遺伝子との間で、塩基配列、推定アミノ酸の相同性を計算した。

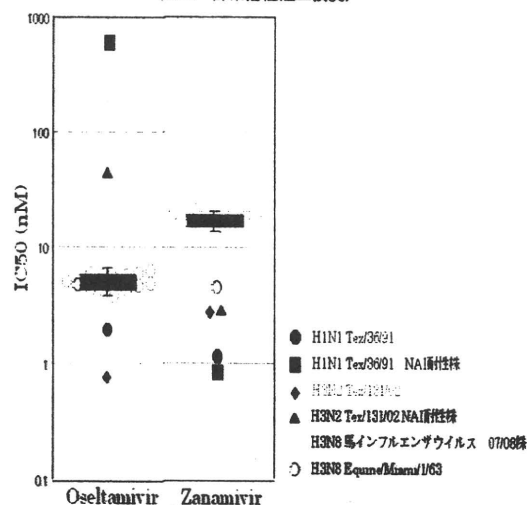
(2) ノイラミニダーゼ阻害試験 (IC₅₀) にタミフル活性体 (GS4071) および Zanamivir に対するノイラミニダーゼ活性 50% 阻害濃度を、蛍光基質 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetyneuraminic acid (MUNANA) を用いた蛍光測定法によって測定した。陽性対照として、A/Texas/36/91 (H1N1) 親株および H274Y 変異株、A/Texas/131/02 (H3N2) および R292K 変異株を用いた。

C. 研究結果

2007 年から 2008 年にかけて、一都一府五県で分離された馬 II 型インフルエンザウイルス 13 株の NA 遺伝子の翻訳領域の塩基配列 (1410 塩基) を決定し、推定アミノ酸配列 (470 残基) を決定した。13 株間の塩基配列は高い相同性を示し、相互に 99.7% 以上の相同性であった。推定アミノ酸配列に関しては、完全に保存されていた。馬 II 型インフルエンザウイルスのプロトタイプである Eq/Miami/63 株との比較では、塩基配列の相同性は 91% であり、アミノ酸配列のそれは 93% であった。NA タンパク質の酵素活性を担う頭部領域において、Eq/Miami/63 株と 07/08 分離株との間で 32 個のアミノ酸置換が認められた。

推定アミノ酸配列をもとに、N1, N2 亜型 NA で知られている NAI 耐性に関与するアミノ酸置換の有無を検索した。その結果、N1 亜型耐性株に認められる H274Y, N2 亜型に認められる E119V, R292K, B 型 NA に認め

図1 馬インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤感受性試験 (50% 酵素活性阻止濃度)



られる R152K, D198N などの耐性獲得に関連するアミノ酸置換は認められなかった。

Eq/Miami/63 株および国内分離株 13 株の Oseltamivir 活性体 (GS4071) および

Zanamivir の 50% 酵素活性阻害濃度 (IC₅₀) も測定した。GS4071 に対する IC₅₀ は、07/08 発生株と Eq/Miami/63 の間で大差がなく、H1N1 亜型 A/Texas/36/91 の約 2.5 倍であった。一方、Zanamivir に対する IC₅₀ は、A/Eq/Miami/1/63 が 4.3nM であったのに対して、13 株の平均は 18.3nM と高い値を示した。H1N1 亜型 A/Texas/36/91 のザナミビルに対する IC₅₀ は、1.1nM であった。

D. 考察

今回試験に供した国内馬インフルエンザ発生起因ウイルスの N8 亜型 NA の推定アミノ酸配列は、同一であり、その結果得られた IC₅₀ 値も均質な値が得られた。GS4071 に対する *in vitro* における感受性が、N1, N2 亜型 NA のそれより低下しており、亜型によって、NAI に対する感受性が異なっていることが示唆された。これまでも GS4071 の IC₅₀ 値が B 型 > N1 亜型 > N2 亜型であることが知られている。Zanamivir の IC₅₀ は、N1, N2 亜型におけるそれらよりも高い値を示したと同時に、プロトタイプである Eq/Miami/63 株と 07/08 年分離株との間でも 4 倍以上の違いが認められた。競走馬等の間で、Zanamivir が治療薬として使われているとは考えられないこと、また N1 亜型、N2 亜型で知られている耐性関連変異も認められていないことから、IC₅₀ の上昇は、自然界での進化の過程での変異による偶然的なものであらうと考えられる。Eq/Miami/63 株と 07/08 年分離株の NA タンパク質の頭部領域のアミノ酸配列においては、32 個のアミノ酸置換が認められており、これらのいづれか、もしくは組み合わせによって、Zanamivir に対する感受性が低下したものと考えられた。

今回の研究で認められた 07/08 年分離 H3N2 亜型馬 II 型インフルエンザウイルスに認められた NAI の IC₅₀ の増加は、*in vitro*

における酵素活性に対するものである。ここで認められた感受性の低下が、*in vivo* における薬効の低下につながるか否かは、不明である。ウイルスの増殖に対する NAI の効果を直接的に測定する方法として、*in vitro* における NAI によるプラーク減少試験が知られている。残念ながら、今回用いた馬 II 型インフルエンザウイルスは、我々の持っている MDCK 細胞できれいなプラークを形成しなかったため、NAI のウイルス増殖に与える影響を測定することができなかった。

E. 結論

07/08 年に国内で分離された馬 II 型インフルエンザウイルスの NAI に対する感受性を、蛍光基質法で測定した。その結果、Zanamivir の IC₅₀ が N1 亜型、N2 亜型 NA と比較して、上昇していることが明らかになった。既知の NAI 耐性に関与するアミノ酸変異は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
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
3. その他
なし

平成 22 年度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

インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性の評価による
ワクチン効果に関する研究

研究分担者：小田切孝人 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 室長

研究協力者：岸田典子、徐紅、伊東玲子、土井輝子、菅原裕美、高下恵美、江島美穂、
藤崎誠一郎、金南希（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）
齊藤玲子（新潟大学大学院医歯学系）

研究要旨

インフルエンザワクチンの変更の必要性を検討する評価法の一つとして、ワクチン接種前後のヒト血清抗体の流行株との交叉反応性を調べた。A/H1N1pdm09 亜型および B 型ワクチンで誘導された抗体は、最近の流行株をよく抑えワクチンの有効性が期待された。一方、A/H3N2 ワクチンでは、ヒトの流行株を反映している MDCK 細胞分離株との反応性が低下しており、ワクチン効果の減弱が懸念され、赤血球凝集抑制（HI）試験に加えて、中和試験による評価も必要である。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。ワクチン株は、国内外の分離株について、幾つかの参照株に対するフェレット感染血清を用いた赤血球凝集抑制（HI）試験による抗原性解析および赤血球凝集素（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の進化系統樹解析などで、ワクチン株からの変化の程度に応じて変更が検討される。一方、これら解析法に加えて、ワクチン接種前後のヒト血清の流行株に対する交叉反応性も、ワクチン株の変更を検討する有効な評価法となる。本研究では、ワクチン接種後のヒト血清の流行株との反応性を各亜型/型に

ついて評価した。

B. 研究方法

・平成 22 年度のインフルエンザワクチン接種前後の成人層（平均値 38.1 歳）および老人層（平均値 82.3 歳）それぞれ 24 ペア血清について、ワクチン株および代表的な最近の流行株との反応性を HI 試験で調べた。
・HI 試験に用いた抗原ウイルスには、ワクチン製造株、その原株、および MDCK 細胞または孵化鶏卵分離の最近の流行株を用いた。（倫理面への配慮）
ワクチン接種前後のヒト血清抗体の採取にあたっては、インフォームドコンセントをとり、倫理委員会の了承を得た。

C. 研究結果

1. A/H1N1pdm09 (パンデミック A/H1N1) ウイルスによる評価。

ワクチン株 A/California/7/2009 接種後のヒト血清抗体について、最近の孵化鶏卵分離株 A/Chirstchurch/16/2010 との反応性を幾何平均抗体価 GMT をもとに比較検討した。A/Chirstchurch/16/2010 は成人層および老人層いずれにおいてもワクチン株の GMT の 150% と高い交叉反応を示し、ワクチンが有効に作用することが示された。

2. A/H3N2 ウイルスによる評価。

ワクチン株 A/Victoria/210/2009 (X-187) 接種後のヒト血清抗体について、孵化鶏卵分離のワクチン類似株および MDCK 細胞分離のワクチン類似株および抗原変異株との反応性を調べた。その結果、X-187 で得られる GMT はひじょうに高く、最近の流行株との GMT と比較すると、孵化鶏卵分離、MDCK 分離いずれも、有効交叉反応性の目安となる 50% 以下であった。そこで、孵化鶏卵分離の代表株 A/Rhode Island/1/2010 の GMT を基準に評価したところ、孵化鶏卵分離株は 70% と高い交叉反応性を示したが、MDCK 細胞分離株は、40~60% 程度と低い反応性であった。このことから、孵化鶏卵に馴化したワクチン株で得られたヒト免疫抗体は、ヒトの流行株を反映している細胞分離株との反応性が低下していることから、ワクチンの効果が減弱していることが懸念された。

3. B 型ウイルスによる評価。

B 型ワクチン B/Brisbane/60/2008 接種後のヒト血清抗体について、ワクチンと同一のビクトリア系統でワクチン類似株である孵化鶏卵分離および MDCK 細胞分離の B/広島/9/2010 株について、反応性を調べた。その結果、MDCK 細胞分離の B/広島/9/2010 株は、ワクチン株に対して 150% の GMT を示し、孵化鶏卵分離株は 55% GMT であった。このことから、B 型ワクチンにおいては、孵化鶏卵へ

の馴化による交叉反応性の低下の問題は無いことが示唆された。一方、異なる山形系統の孵化鶏卵分離株 B/Wisconsin/1/2010 は 60% GMT であり、山形系統ウイルスが流行した場合は、ワクチン効果は期待できないことが示された。

D. 考察

ワクチン接種後のヒト血清の流行株に対する交叉反応性の評価成績は、ワクチン株の変更の有無を判断する上で、有用な情報となる。この解析により、A/H3N2 亜型では、孵化鶏卵に馴化したワクチン株で誘導されるヒトの免疫抗体は、流行株との反応性が低下する可能性が指摘された。この問題を中和試験などでも評価し、同様の成績が得られるか検討が必要である。一方、A/H1N1pdm09 亜型および B 型ワクチンではそのような問題は起こらず、ワクチンの有効性が期待できる。ワクチンの製造基剤として孵化鶏卵を使わざるを得ない現状では、A/H3N2 ワクチンで見られる問題点は、今後とも毎年起こり得ることであり、できるだけ早い培養細胞ワクチンの導入が必要である。

E. 結論

1. ワクチン接種前後のヒト血清抗体と流行株との交叉反応性を HI 試験で調べ、ワクチンの有効性を評価した。
2. A/H1N1pdm09 亜型、B 型ワクチンは流行株をよく抑え、これらワクチンの有効性が期待された。
3. A/H3N2 ワクチンでは、ヒトの流行株を反映している MDCK 細胞分離株との反応性が低下しており、ワクチン効果の減弱が懸念された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, 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.* 2010 Jan;82(1):128-37.

Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, Grohmann G, Hay A, Kelso A, Klimov A, Odagiri T, Smith D, Russell C, Tashiro M, Webby R, Wood J, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009-2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine.* 2010 Feb 3;28(5):1156-67. Epub 2009 Dec 9.

Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virol J.* 2010 Mar 5;7(1):53

Makoto Ujike, Kozue Shimabukuro, Kiku

Mochizuki, Masatsugu Obuchi, Tsutomu Kageyama, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan
Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A (H1N1) during 2007–2009 Influenza Seasons, Japan *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 6, 926-935, 2010

Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K. Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. *Microbiol Immunol.* 2010 Feb;54(2):81-8.

Teiichiro Shiino Nobuhiko Okabe, Yoshinori Yasui, Tomimasa Sunagawa, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Hong Xu, Emi Takashita, Akane Anraku, Reiko Ito, Teruko Doi, Miho Ejima, Hiromi Sugawara, Hiroshi Horikawa, Shuji Yamazaki, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruo Watanabe. Molecular Evolutionary Analysis of the Influenza A(H1N1)pdm, May–September, 2009: Temporal and Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan. *PLoS ONE* volume5 | Issue6 | e11057-e11067, 2010

Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer DR,

Carter WA, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* 2010 Oct;82(10):1754-61.

Yuma Iwai, Hitoshi Takahashi, Dai Hatakeyama, Kazunori Motoshima, Minoru Ishikawa, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoshihisa Sei, Kentaro Yamaguchi and Takashi Kuzuhara Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from thalidomide *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Volume 18, Issue 14, 15 July 2010, Pages 5379-5390

Nongluk Sriwilaijaroenab, AkioKadowakic, YurikoOnishic, NobukiGatoc, MakotoUjike, TakatoOdagirid, MasatoTashiro, Yasuo Suzuki Mumefuralandrelated HMF derivatives from Japanese apricot fruitjuice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A(H1N1) virus *FoodChemistry* 127, 1-9, 2011

Makoto Ujike, Miho Ejima, Akane Anraku, Kozue Shimabukuro, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Xu Hong, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009–2010 *Emerging*

Infect Dis.: 17, 470-479, 2011

2. 学会発表

Mina Nakauchi, Tsutomu Kageyama, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Emi Takashita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kunihiro Oba, Nami Konomi, and the working group for influenza virus surveillance in Japan.: A rapid genotyping of oseltamivir-resistant or susceptible pandemic A/H1N1 2009 influenza viruses by duplex RT-PCR assay. *Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010, September*

Takashita E, Ujike M, Ejima M, Fujisaki S, Obuchi M, Kim N, Kishida N, Xu H, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Tashiro M, Odagiri T. Detection and characterizations of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses in the 2009/10 season in Japan. *Options for the Control of Influenza VII, September 2010*

Kishida N, Xu H, Takashita E, Obuchi M, Fujisaki S, Ujike M, Ito R, Doi T, Sugawara H, Ejima M, Kim N, Ami Y, Suzaki Y, Yamashita K, Yasui Y, Tada Y, Okabe N, Tashiro M, Odagiri T. Characterizations of influenza viruses isolated during the 2009/10 season in Japan and neighboring countries. *Options for the Control of Influenza VII, September 2010*

小田切孝人 新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルスとワクチン製造、接種戦略 第 50 回 日本呼吸器学会学術講演会 京都、4 月 (2010)

小田切孝人 新型インフルエンザウイルス

の特徴 第51回日本臨床ウイルス学会 高松、6月(2010)

高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、氏家誠、小淵正次、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2009/10シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性pandemic A/H1N1株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月。

浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美名、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人：新型インフルエンザウイルス（H1N1pdm）の増殖性に関する検討。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月。

岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、網康至、須崎百合子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小淵正次、氏家誠、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2009/10シーズンのインフルエンザ流行株と平成22年度のワクチン株。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月。

中内美名、高山郁代、高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、氏家誠、小淵正次、大場邦弘、許斐奈美、小田切孝人、田代真人、影山努、全国地方衛生研究所：A/H1N1pdmタミフル耐性株の迅速検出法の開発。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11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

**「RT-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay を利用した
オセルタミビル耐性新型インフルエンザスクリーニング方法の確立および
医療従事者コホートにおける新型インフルエンザ感染に関する研究」**

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

協力研究者：貫和奈緒 小田切崇 古瀬祐気 鈴木陽 東北大学医学系研究科 微生物学分野

研究要旨

研究 1：タミフル耐性新型インフルエンザウイルスのスクリーニングとして NA 遺伝子の 275 番目の histidine から tyrosine の変異 (H275Y) を特異的に検出する reverse transcriptase PCR/restriction fragment length polymorphism (RT-PCR/RFLP) assay を確立した。2009 年に仙台市内で分離された新型インフルエンザウイルス 133 株でスクリーニングを行ったが、すべてタミフル感受性であった。

研究 2：新型インフルエンザに対する不顕性感染を調査するため、医療従事者を対象としたコホート調査をおこなった。不顕性感染の割合は、ウイルス分離で 14.3%、HI 試験で 20.0%、中和試験では 50.0% であった。今後の感染症対策を考える上で医療従事者の不顕性感染は非常に重要な要素であると考えられる。

**研究 1：「RT-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay を利用した
オセルタミビル耐性新型インフルエンザスクリーニング方法の確立」**

貫和奈緒、古瀬祐気、鈴木陽 押谷仁

【背景】

新型インフルエンザは、2009 年のはじめより北アメリカから世界各国に感染拡大した。このように急速に感染拡大する状況下ではワクチンの生産が間に合わなかったため、抗インフルエンザ薬の役割が期待された。過去にあまり使用経験が無い途上国も含め、多くの国や地域において使用された。しかし、処方量が増えると同時に、耐性ウイルスの出現が危惧される。2010 年 3 月現在、全世界で 267 株のオセルタミビル耐性ウイルスの散发例の報告に留まっているが、2007-2008 年シーズンにおいて季節性インフルエンザの耐性ウイルスが短期間で世界各地に広がったことより、今後薬剤耐性新型インフルエンザが流行株となる可能性が考えられる。そのため、WHO が行っている National Influenza Center (NIC) を結んだインフルエンザネットワークのサーベイランスにおいて、耐性ウイルスのスクリーニングが求められてくる。耐性ウイルスの検出には、ノイラミターゼ阻害試験や NA 遺伝子のシーケンスがあるが器材やその維

持のコストが高いため、サーベイランスを拡大するには簡略な検出方法が望まれる。そこで、本研究ではタミフル耐性新型インフルエンザのスクリーニングとして NA 遺伝子の 275 番目の histidine から tyrosine の変異 (H275Y) を特異的に検出する reverse transcriptase PCR/restriction fragment length polymorphism (RT-PCR/RFLP) assay の確立を目的とした。

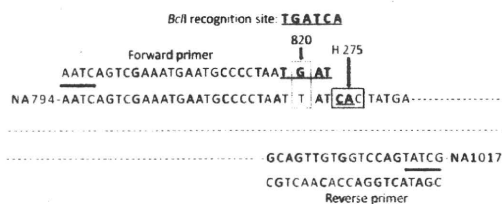
【方法】

2009 年の 7 月から 12 月に、仙台市内の医療施設をインフルエンザ様症状にて受診した患者の咽頭拭い液を採取し、それらを MDCK 細胞に接種しウイルス分離を行った。分離株より RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にて RNA の抽出を行い、インフルエンザに特異的な primer Uni12 (Hoffmann et al., 2001) を用いて complementary DNA を作成した。また、耐性ウイルスのコントロールとして岩手県環境保健研究センターから分与して頂いた A/Iwate/3/2009 (H1N1) を使用した。

図 1 に作成したプライマーとウイルス遺伝子を

比較した模式図を示す。まず、275 番目の histidine(CAC)もしくは tyrosine(TAC)をコードする塩基を挟んで増幅するプライマーを設計した。その際、既存の制限酵素ではいずれの配列も認識し消化できないため、forward primer の3' から3番目をTからAになる変異を入れ制限酵素 *Bc*II が histidine をコードするアミノ酸CAC のみを認識し消化できるようにした。これにより、275 番目が histidine (感受性) である場合のみ制限酵素 *Bc*IIにより PCR 産物が 198 bp と 26 bp に開裂し、 tyrosine (耐性) の場合 224 bp のままとなる。

図1 プライマーとウイルス遺伝子の比較



分離株を設計したプライマーと *TaKaRa Ex Taq* (TAKARA, Shiga, Japan) を用いて増幅後、PCR 産物 5 μ L を制限酵素 *Bc*II (NEW ENGLAND Biolabs) にて処理し、4% のゲル (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた電気泳動を行った。また Big Dye Terminator (version 1.1; Applied Biosystem, Foster City, CA), および 3130 genetic analyzer (Applied Biosystem) を用いて同領域の塩基配列を確認した。

【結果】

研究期間中に分離された 133 株の新型インフルエンザから 30 株を無作為に抽出し、RFLP をおこなったところ、すべてが感受性株であり、シーク

エンスで確認された。また、耐性株である A/Iwate/3/2009(H1N1) は、制限酵素処理で開裂しなかった。残りの 103 検体についても同様に検討を行ったが、すべて感受性であった。

【考察】

今回の新型インフルエンザの流行において、多くの国々でタミフルが処方されると同時に備蓄も行われた。そのため、これらの薬剤を有効活用する上で、耐性ウイルスのサーベイランスおよびそのスクリーニング方法の必要性が増す結果となった。本研究で検討した RFLP は、PCR が出来る施設でも施行可能な簡単なスクリーニング方法であり、すでに季節性インフルエンザにおいて同様な方法が確立されている (Guo et al., 2009; Saito et al., 2002)。途上国など、実験機材が限られた地域に置いては、有用な検査方法であると考えている。

今回開発した方法は、H275Y を特異的に検出する方法である。タミフル耐性に関与する他の遺伝子変異が報告されているが、この方法を応用すれば、すべての変異に対応した RFLP の開発が可能である。今後は、世界の耐性ウイルスの出現状況に合わせて、この RFLP を調整して行く事で、有効活用ができると考えている。

【謝辞】

臨床検体を採取して下さった「かわむらこどもクリニック」の川村和久先生、「かやば小児科医院」の萱場潤先生、耐性ウイルスを提供して下さった岩手県環境保健研究センター保健科学部の高橋雅輝先生にこの場をお借りして感謝いたします。

研究2：「医療従事者における新型インフルエンザの不顕性感染」

小田切崇、鈴木陽 押谷仁

【背景】

2009 年 4 月の新型インフルエンザの発見を踏まえ、世界各地でさまざまな対策が講じられたが、結果的には世界規模で流行してしまった。現在、行われているインフルエンザ対策の多くは症状を呈した人を主な対象としているが、潜伏期にある無症候性の感染者と同様に、不顕性感染者の存在が問題となり得る。もし、不顕性感染者が病原体

を多く排出しているとなると、自覚しないうちに病原体を伝播してしまう可能性が高く、感染症の封じ込めを困難にする。

医療従事者は病原体に暴露する可能性が一般より高いため、新型インフルエンザ対策においてはハイリスクグループにあげられている。しかし、これらの対策は医療従事者を守る事を前提としている。もし、医療従事者における不顕性感染が高頻

度で発生していた場合、院内感染の原因となりえるため、感染症コントロールを考える上で非常に重要となる。

不顕性感染の確認は横断的調査では非常に困難であり、コホート調査などの追跡調査が必要となってくる。そこで、本研究では医療従事者を対象としたコホート調査を行い、医療従事者における無症候性感染の発生状況について調査を行った。

【方法】

本研究では 2009 年の第 38 疫学週から翌年 2010 年の第 14 疫学週（2009 年 9 月から 2010 年 3 月）までを研究対象期間とした。対象となったのは、宮城県仙台市内 18 ヶ所の外来小児科医療施設に勤務する医師 25 名と看護師をはじめとするその他 113 名の計 138 名とした(表 2-1)。これらの対象者から、定期的に咽頭拭い液および血清を採取し、インフルエンザウイルスへの感染を確認すると同時に、症状の有無を連日記録してもらった。

表 2-1 研究参加者

	人数	割合 (%)
性別		
男性	27	19.6
女性	104	75.4
無回答	7	5.1
職種		
医師	23	16.7
看護師	32	23.2
医療事務	33	23.9
薬剤師	24	17.4
その他	5	3.6
無回答	21	15.2
年齢分布		
10歳代	1	0.7
20歳代	24	17.4
30歳代	23	16.7
40歳代	20	14.5
50歳代	18	13.0
60歳代	1	0.7
70歳代	2	1.4
無回答	49	35.5

ウイルス分離

咽頭ぬぐい液を原則医師からは 1 週間に 1 回、その他の医療従事者からは 2 週間に 1 回の定期採取を行った。それらを MDCK 細胞に接種し、インフルエンザウイルスの分離を試み、同定は赤血球凝集阻止試験もしくは A 型インフルエンザウイルスを鑑別できる PCR により行った。

抗体価測定

血清を原則医師からは 2 週間に 1 回、その他の医療従事者からは 4 週間に 1 回の定期採取を行った。血清を RDE II で処理し、

A/California/07/2009 に対する抗体を赤血球凝集阻止試験および中和試験にて行った。これらの試験に使用したウイルスおよびウイルス抗原は国立感染症研究所から分与して頂いた。

健康調査アンケート

研究期間中、対象者の健康状態を把握するために対象者全員に体温、症状の有無等の健康状態に関するアンケートに連日記入してもらった。そのアンケートを基に急性呼吸器疾患 (ARI)、インフルエンザ様疾患 (ILI)、その他の軽症、症状なしの 4 つのグループに分けて抗体価測定と合わせて解析を行った。(表 2-2)

表 2-2 症例定義

症例	定義
ARI	咳、鼻閉、くしゃみ、咽頭痛等の上気道症状
ILI	ARI+38℃以上の発熱、倦怠感、筋肉痛
軽症	頭痛、下痢
症状なし	自覚症状なし

【結果】

ウイルス分離

全研究対象者 138 名中から研究開始前に新型インフルエンザウイルス感染が確認された 3 名および研究期間中の定期検体採取が不可能であった 45 名を除く 90 名を解析対象者とした(表 2-3)。このうち、7 名 (7.8%) において研究期間中に採取された咽頭ぬぐい液から新型インフルエンザウイルスが分離された。ウイルス分離陽性であった 7 名のうち 1 名 (14.3%) は症状がみられなかったため、不顕性感染であったとした。

表 2-3 解析対象者

	ウイルス分離 N = 90		抗体価測定 N = 61	
	人数	割合 (%)	人数	割合 (%)
性別				
男性	21	23.3	11	18.0
女性	66	73.3	48	78.7
無回答	3	3.3	2	3.3
職種				
医師	18	20.0	8	13.1
看護師	27	30.0	17	27.9
医療事務	23	25.6	13	21.3
薬剤師	17	18.9	12	19.7
その他	3	3.3	2	3.3
無回答	2	2.2	9	14.8
年齢分布				
10歳代	1	1.1	1	1.6
20歳代	18	20.0	14	23.0
30歳代	23	25.6	11	18.0
40歳代	17	18.9	8	13.1
50歳代	16	17.8	7	11.5
60歳代	1	1.1	0	0.0
70歳代	2	2.2	2	3.3
無回答	12	13.3	18	29.5

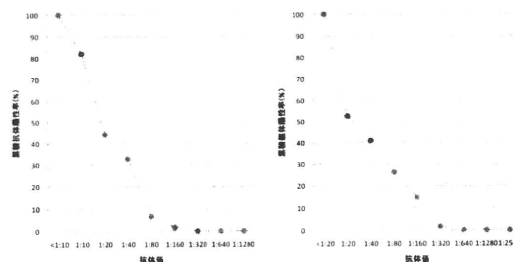
抗体調査

赤血球凝集阻止試験 (HI 試験) による抗体価測定では、研究開始前に新型インフルエンザウイルス感染が確認された3名、定期検体採取が不可能であった21名および連日の健康調査アンケートを回収できなかった53名を除く61名を解析対象とした。解析対象となった61名の研究開始時に採取した血清中の抗体価を測定したところ、20名 (32.8%) が 1:40 以上の抗体価を示した(図 2-1)。また本研究期間中に医療従事者へのワクチン接種が開始されたため、感染による抗体価の上昇とワクチン接種による抗体価の上昇を明確に区別するために、更に上記の61名中ワクチン接種をした対象者を除く11名に焦点を絞って解析を進めた。研究期間中における抗体価の経時変化をみると、そのうち5名で研究期間中に4倍以上の抗体価上昇が確認され、HI 試験による感染率は45.5%であった。また並行して行った連日のアンケート調査から症状別に分類してみると1名 (20.0%) はインフルエンザ様疾患 (ILI)、3名 (60.0%) が急性呼吸器疾患 (ARI) であり、残りの1名 (20.0%) は症状がなかったことが判明し、医療従事者における不顕性感染の存在が確認された。

中和試験も HI 試験同様61名を対象にして解析を行った。この61名の研究開始時に採取された血清中の抗体価を測定した結果、25名 (41.0%) が 1:40 以上の抗体価を保有しているという結果を示した(図 2-1)。また61名のうち HI 試験と中和試験の双方で 1:40 以上の抗体価を示したものは14名であった。更に 1:40 以上の抗体を保有していたものおよび研究期間中にワクチンを接種したものを除く11名に焦点を絞り、抗体価の経時変化をみると11名のうち6名 (54.5%) で研究期

間内に4倍以上の抗体価症状が確認され、新型インフルエンザウイルス感染が疑われた。この感染が疑われた6名を、並行して行った連日の健康調査アンケートを基に症状別に振り分けてみると、ILI が3名 (50.0%)、残りの3名 (50.0%) は症状がみられなかった。

図 2-1 調査開始時の抗体価



【考察】

本研究から医療従事者における新型インフルエンザウイルス感染が確認され、各測定方法別の感染率はウイルス分離で7.8%、HI 試験で45.5%、中和試験で54.5%となった。抗体価測定の結果からみると医療従事者の約2人に1人が感染する可能性があることが示唆される結果となった。一般人を対象とした新型インフルエンザウイルスに関してウイルス分離からみた感染率は10%~30%程度という報告がある(Kumar S et al., 2009; Miller E et al., 2009)。同様に抗体価測定からみた感染率もカットオフ値等に統一見解がないため、数値にばらつきがあるが、それらを統合すると20%~40%程度であると推測され(Kumar S et al., 2009; Miller E et al., 2009; Chen MI et al., 2010; Deng Y et al., 2010; Tandale BV et al., 2010; Lee VJ et al., 2010; Aho M et al., 2010)それと比較しても本研究結果は妥当性があると考えられる。一方、医療従事者の季節性インフルエンザにおける感染率は20%~30%であるという報告があり(Elder AG et al., 1996; Wilde JA et al., 1999; Williams CJ et al., 2008)、本研究結果と比べて低いことより、ウイルスに暴露する可能性が一般人より高い医療従事者においては、通常季節性インフルエンザと比較して今回の新型インフルエンザの方が感染するリスクが高かった事が伺える。

医療従事者の不顕性感染も確認され、ウイルス分離では14.3%、HI 試験で20.0%と同程度であるのに対し、中和試験では50.0%と著しく高かった。一般人を対象とした新型インフルエンザウイルスに関する血清疫学調査においても不顕性感染を示

唆するデータが報告されているが、その頻度も10%程度から60%とばらつきがあった(Kumar S et al., 2009; Tandale BV et al., 2010; Lee VJ et al., 2010; Aho M et al., 2010)。既存のインフルエンザ対策は症状を呈した感染者が出た場合の対処法を根本にしているため、不顕性感染者に関する対策および対処法は明確にされていない。本研究で明らかになった不顕性感染者の存在は、行動を制限されることもなくウイルスを広範囲に散布し続けるため、流行を拡大させるキーファクターとなる可能性が十分に考えられる。そのため今後のインフルエンザ対策には、症状を呈した感染者の対策のみならず、不顕性感染者の存在についても盛り込んだ対策が必要であると考えられる。また、現状の医療従事者向けのインフルエンザ対策は医療従事者の感染予防を中心とした対策である。しかし医療従事者の不顕性感染の存在があきらかになった以上、今後は医療従事者から患者を守る対策も考慮する必要がある。

【結論】

本研究から医療従事者の新型インフルエンザウイルス感染と不顕性感染が確認された。より感染リスクが高いと考えられる医療従事者の感染、さらには医療従事者を介して感染していない別の患者への感染を防ぐという意味でも、今後の感染症対策を考える上で医療従事者の不顕性感染は非常に重要な要素であると考えられる。

【謝辞】

研究を行うにあたりご尽力いただいた仙台外来小児科懇話会代表である、かわむらこどもクリニックの川村和久先生をはじめ、検体を提供して下さった各医療施設の先生方にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

研究発表

1. 論文発表

【英文】

- Furuse Y. et al. Comparison of selection pressures on the HA gene of pandemic (2009) and seasonal human and swine influenza A H1 subtype viruses. *Virology*. 2010 Sep 30;405(2):314-21.
- Nukiwa N, et al. Simplified screening method for detecting oseltamivir resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by a RT-PCR-restriction

fragment length polymorphism assay. *J Virol Methods*. 2010 Sep 15

- Furuse Y, et al. Reassortment between Swine Influenza A Viruses Increased their Adaptation to Humans in Pandemic H1N1/09. *Infection, Genetics & Evolution*, May 2010;10(4):569-74

【和文】：なし

学会発表

【国際学会】

鈴木陽 他、
“Asymptomatic A(H1N1)pandemic infection among healthcare workers” 2010
International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta

【国内学会】なし

知的財産権の出願・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

鳥型からヒト型への変化に関する分子基盤および抗インフルエンザ創薬

研究分担者 鈴木康夫 中部大学生命健康科学部 教授

研究要旨 1) 簡便なヒトおよび高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) レセプター認識特異性を識別監視出来るキットのプロトタイプを作製した。2) ブタの上、下気道、肺におけるインフルエンザウイルスレセプター *N*-グリカンには、ヒトの上気道に発現するヒト型糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-) が鳥型シアロ糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-) に比べ 3~5 倍多いことを見出した。2) ラオス人民民主主義共和国における H5N1 分離株にヒト間伝播可能な変異および NA 阻害剤抵抗性株を見出した。3) 1918 年に発生したスペインインフルエンザの病原性発現にウイルス NA スパイクの細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸性安定性に関わることを発見した。7) 日本産の梅から製造される梅肉エキスに存在する新物質ムメフラールは、多様な抗インフルエンザウイルス (Pandemic Influenza (H1N1) 2009 を含む) 活性を持つことを明らかにした。8) インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ機能を阻害する新しい合成分子を見出した。

A. 研究目的

H5N1 ウイルスの変異してヒト-ヒト間伝播が可能となる変異を事前に予知する技術を開発するとともに、新型インフルエンザウイルスにも適応可能な抗インフルエンザ剤を創製する。

B. 研究方法

イムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖結合特異性監視法を様々な条件で構築した。*N*-型-シアロ糖鎖の精密構造は、高速液体クロマト-質量分析により調べた。様々な天然、化学合成化合物につき、インフルエンザウイルス感染阻害、ヘマグルチニン、シアリダーゼ活性阻害評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1. 合成シアロ糖鎖ポリマー、抗H5モノクローナル抗体およびイムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識 (Neu5Ac α 2-3Gal or 2-6) を簡便かつ迅速に測定するキット「軽量 (約

5 グラム)、反応時間15分で完了」を開発した。さらに高度化かつ適用範囲の拡大を目指す「現状では16HAのウイルスが必要」。

2. ブタの上気道、下気道、肺における *N*-グリカンの詳細な解析を行い、ブタの呼吸器には、ヒト型シアロ糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-) が鳥型シアロ糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-) に比べ 3~5 倍多いことを見出した。6) H5N1 ウイルスに感受性である動物 (ネコ、イヌ、トラ、ニワトリなどの家禽) におけるレセプターシアロ糖鎖の分布をレクチンを用いて調べた。その結果、ニワトリ個体からヒトへの適応性を獲得した変異 H5N1 が発生する可能性を見出した。

3. ラオス人民民主主義共和国における H5N1 分離株にヒト間伝播可能な変異および NA 阻害剤抵抗性株を発見した。

4. タイ国で分離されたブタ H1N1 のレセプター結合特異性はヒト型レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal) 結合性であるが、別の宿主である発育鶏卵しょう尿液中で培養すると鳥型レセプター (Neu5Ac α 2-3Gal) 結合性変異を獲得することを見出した。

5. 1918年に発生したスペインインフルエンザの病原性発現にウイルスノイラミニダーゼスパイクの細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸性安定性に関わることを発見した。この機構は次期パンデミックインフルエンザウイルスの発生監視技術開発に有用である。

6. 日本産の梅から古式法により製造される梅肉エキスに存在する新物質ムメフラールは、多様な抗インフルエンザウイルス活性を持つ

ことを明らかにした。本分子は、**Pandemic Influenza (H1N1) 2009** ウイルスに対しても効果的であった。

7. インドネシアブタから分離されたH5N1にヒト型レセプター(Neu5Ac2-6Gal) への結合性を獲得した株を見出した。
8. インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼスパイクの機能(シアリダーゼ活性)を阻害する新しい分子を合成し、その活性を見出した。これは、シアリ酸の誘導体で、**C9 N-acyl Neu5Ac2en** の構造を持つ。これは、これまで臨床に使われている4-guanizino-Neu5Ac2en(ザナミビル)に匹敵する強力な抗シアリダーゼ活性を持つことを見出した。

D. 考察

昨年度に引き続き、イムノクロマトを原理とする簡便な、H5N1 ウイルスの鳥→ヒトレセプター結合特異性の変異監視キットのプロトタイプを改良、最低 32HAU のウイルス濃度で、15 分以内に測定可能なものを作製した。これを、H5N1 の分離株に適用したところ、有効であった。さらに感度上昇とクレード間における反応性の格差を最小にする改良を重ねる。また、スペインインフルエンザウイルスは鳥インフルエンザウイルスが持つ細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸性に安定という性質を保持しており、これにより、宿主細胞内の増殖性が飛躍的に増加し、病原性が高くなることを見出した。この機構は次期パンデミックインフルエンザウイルスの発生監視技術開発に有用である。インドネシアのブタからヒト型レセプターシアロ糖鎖に結合できる H5N1 が見出された。このように、H5N1 が遺伝子の混合(遺伝子再集合)を起こすのではなく、一部だけの変異して、ヒト型レセプター α 2-6 に結合するようになる変異もパンデミック発生に取って重要な因子となるだろう。

E. 結論

9. 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト→ヒト間伝播可能な変異を高価な機器、複雑な操作なしで高速、高感度に検出するキットの試作を達成し、有用性を確認した。今後、この手法、キットは、H5N1の鳥→ヒトへの適応性の監視に、地球規模で応用可能としたい。H5N1ウイルスは遺伝子再集合のみならずHA分子内アミノ酸点変異によってもヒト型レセプターへの結合性を獲

得し、パンデミックを起こす可能性を示唆する結果を得た。今後、H5N1ウイルスのレセプター結合特異性のヒトへの適応性を監視することは極めて重要となるだろう。さらに、日本古来の製法で造った梅肉エキス中のムメフラールがHA、NA感染性のいずれも阻害することを見出した。これは、古来の民間の食品中に、**Pandemic Influenza (H1N1) 2009**の生物機能を複数阻害できる分子が存在することを初めて見出したものであり、インフルエンザの予防と古来受け継がれてきた民間食素材とが密接に関わることを示すもので興味深い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nongluk Sriwilajaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Nobuhiro Takemae, Takehiko Saito, Hiroaki Hiramatsu, Koichi Kato, Yasuo Suzuki: *N-glycans from porcine trachea and lung: Predominant NeuAc2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor. PLoS ONE*, 6, issue 2, e-16302 (2011)
2. Sukanya Thongratsakul, Yasuo Suzuki, Hiroaki Hiramatsu, Thavajchai Sakpuaram, Theerapol Sirinarumitr, Chaithep Poolkhet, Pattra Moonjit, Rungrueang Yodsheewan, Thaweesak Songserm Avian and human influenza A virus receptors in trachea and lung of animals. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology*, 28, 294-301 (2010)
3. Tadanobu Takahashi, Yuuki Kurebayashi, Kumiko Ikeya, Takashi Mizuno, Keijo Fukushima, Hiroko Kawamoto, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication. *PLoS ONE* Vol. 5, Issue 12 (Nov.), e-15556 (2010)
4. Chairul A. Nidom, Ryo Takano, Shinya Yamada, Yuko Sakai-Tagawa, Syafril Daulay, Didi Aswadi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Kyoko Shinya, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka: Influenza A(H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010 Oct; [Epub ahead of print] DOI: 10.3201/eid1610.100508
5. David A. Boltz, Bounlom Douangneun, Phouvong Phommachanh, Settha Sinthasak, Ricarda Mondry, Caroline Obert, Patrick Seiler, Rachael Keating, Yasuo Suzuki, Hiroaki Hiramatsu, Elena A. Govorkova, Robert G. Webster: Emergence of H5N1 Avian Influenza Viruses with Reduced Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors and Novel Reassortants in LAO PDR *J. gen Virol.*, 91, 949-959 (2010)

6. Nobuhiko Takemae, Ruttapong Ruttanapumma, Sujira Parchariyanon, Shuji Yoneyama, Tsuyoshi Hayashi, Hiroaki Hiramatsu, Nongluk Sriwilaijaroen, Yuko Uchida, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Yasuo Suzuki, Takehiko Saito: Alterations in receptor binding properties of swine influenza viruses of H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J. gen. Virol.*, 91, 938-948 (2010)

3. その他
なし

2. 学会発表

1. Yasuo Suzuki: Highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) –Avian H5N1 is now acquiring human receptor specificity and anti-influenza drug discovery-. The 8th China-Japan International Conference of Virology Abstract book pp.21, July 4-7, 2010, Harbin, China(発表 : 7月5日)
2. Yasuo Suzuki: Glycoviropology of Influenza virus ·Highly pathogenic avian H5N1 viruses that acquire human receptor specificity- 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul 2010. Abstract book pp. 14-15 July, 15-17 (July 16), Seoul National University, Seoul, Korea, Japanese Society for Neurovirology, (2010).
3. Yasuo Suzuki: Highly pathogenic avian H5N1 viruses that acquire human receptor specificity and anti-influenza drug discovery
BIT's 1st World Congress of Virus and Infections 2010, July 31-August 3, 2010, Busan Exhibition & Convention Center, Korea. Abstract book, pp 195 (2010)
4. Yasuo Suzuki: Mechanism of host range mutation of influenza viruses. (Aug. 26th, 2010), Sialoglyco 2010 (13th International Congress on Biology and Chemistry of sialic acids), Kongresshotel Potsdam, Potsdam, Germany, August 21-26 (2010) Abstract Book p.55 (2010)
5. 鈴木康夫: パンデミックインフルエンザと抗インフルエンザウイルス素材の開発 Chubu University's Week in World Expo 2010 Shanghai China, DEVNET 国際交流館, 2010年9月1日(水) ~7日(火)

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

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oakley, A J., Barrett, S., Peat, T.S., Newman, J., Victor A., Streltsov, V. A., Waddington, L., Saito, T., Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J. L.	Structural and functional basis of resistance to neuraminidase Inhibitors of Influenza B viruses.	Med. Chem.	DOI: 10	1021/jm100621s	2010
Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T.	Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus.	J. Medi. Virol.	83	10-15	2011
Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujiike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M.	Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional and real-time RT-PCR assays.	Jpn. J. Infect. Dis.			in press, 2011
Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniel, R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Opp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zanbon, M., Public Health Implications of Oseltamivir Resistance:	Emergence in Pre-pandemic Influenza A(H1N1) Viruses during the 2007 - 2009 Seasons.	Influenza and other respiratory viruses Resp. Viral. Infect.			in press, 2011
Isoda N, Tsuda Y, Sakoda Y, and Kida H.	Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos.	Arch Virol,			2010 in press.
Feng F, Miura N, Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H and Nishimura S.	Novel trivalent anti-influenza reagent.	Bioorg Med Chem Lett	20	3772-3776	2010
Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T.	Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1.	J Biol Chem.			2010

Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H.	Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (<i>Cygnus cygnus</i>) found in northern Japan in 2008.	Virus Genes	41	351-357	2010
Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R	Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory.	Virology	406	88-94	2010
Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T.	Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice.	J Neurovirol	16	125-132	2010
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.	Amelioration of pneumonia with <i>Streptococcus pneumoniae</i> 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	2010
Itoh Y, Ozaki H, Ishigaki H, Sakoda Y, Nagata T, Soda K, Isoda N, Miyake T, Ishida H, Okamoto K, Nakayama M, Tsuchiya H, Torii R, Kida H, and Ogasawara K.	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	2010
Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H and Takada A.	Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin.	PLoS One	5	e8553.	2010
Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Ozawa M, Watanabe T, Sakabe S, Li C, Kim JH, Myler PJ, Phan I, Raymond A, Smith E, Stacy R, Nidom CA, Lank SM, Wiseman RW, Bimber BN, O'Connor DH, Neumann G, Stewart LJ, Kawaoaka Y.	Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus.	PLoS Pathog	6	e1001034	2010

Yuki, N., Takahashi, Y., Ihara, T., Ito, S., Nakajima, T., Funakoshi, K., Furukawa, K., Kobayashi, K., Odaka, M.	Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination.	J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry			[Epub ahead of print] 2010
Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K., Moriyama, S., Takahashi, Y.	Unique properties of memory B cells of different isotypes.	Immunol. Rev.,	237,	104-116	2010
Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H.	Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant.	Hum Vaccin.	7		2011
Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J.	Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids.	Jpn J Infect Dis.	64(1)	40-9	2011
Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H.	Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus	J Med Virol.	82(10)	1754-61.	2010
Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T.	Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer.	PLoS One.	5(4)	e10256.	2010
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
Ainai 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.	82(3)	476-84.	2010
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.	63(1)	8-15.	2010

Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai 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.	63(1)	67-71	2010
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. Jan.	63(1)	72-4.	2010
M.Ujike, M.Ejima, A.Anraku, K.Shimabukuro, M.Obuchi, N.Kishida, Xu Hong, E.Takashita, S.Fujisaki, K.Yamashita, H.Horikawa, Y.Kato, A.Oguchi, N.Fujita, M.Tashiro, T.Odagiri, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009-2010	Emerging Infect Dis.	17	470-479	2011
N.Sriwilajaroenab, A.Kadowakic, Y.Onishic, N.Gatoc, M.Ujike, T.Odagiri, M.Tashiro, Y.Suzuki	Mumefuralandrelated HMF derivatives from Japanese apricot fruitjuice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A(H1N1) virus	FoodChemistry	127	1-9,	2011
Y.Iwai, H.Takahashi, D.Hatakeyama, K.Motoshima, M.Ishikawa, K.Sugita, Y.Hashimoto, Y.Harada, S.Itamura, T.Odagiri, M.Tashiro, Y.Sei, K.Yamaguchi and T. Kuzuhara	Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from thalidomide	Bioorganic & Medicinal Chemistry	18	5379-5390	2010,
T.Shiino N.Okabe, Y.Yasui, T.Sunagawa, M.Ujike, M.Obuchi, N.Kishida, H.Xu, E.Takashita, A.Anraku, R.Ito, T.Doi, M.Ejima, H.Sugawara, H.Horikawa, S.Yamazaki, Y.Kato, A. Oguchi, N.Fujita, T.Odagiri, M.Tashiro, H.Watanabe.	Molecular Evolutionary Analysis of the Influenza A (H1N1)pdm, May-September, 2009: Temporal and Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan.	PLoS ONE	5(6)	e11057-e11067	2010
Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K.	Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection.	Microbiol Immunol.	54(2)	81-8	2010