

T細胞を分離した。

(3)不活化ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

ヒト末梢血細胞あるいは記憶B細胞とT細胞を移入した NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに不活化ワクチン（季節性として A/New Caledonia/20/99、新型として A/Narita/1/2009）を接種した。10日後に、脾臓の摘出と採血を行い、脾臓中のヘマグルチニン（HA）に特異的な抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて、血清中に含まれる抗 HA 抗体価を ELISA 法にて測定した。

（倫理面への配慮）

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会の承認を得てから行い、ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得てから行った。

C. 研究結果

(1)不活化ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

季節性ワクチン接種前のドナー由来末梢血単核球を NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに移植した。不活化 New Caledonia ワクチンをこのマウスに接種後、脾臓における HA に特異的な抗体産生細胞の数を測定した（図1）。すると、末梢血単核球を移植したマウスでは、HA 特異的な IgG 抗体産生細胞が検出された。さらに、IgG サブタイプを調べると、IgG1 と IgG3 から構成されることが判明した。

(2) H1N1pdm 不活化粒子に対する交差記憶応答の測定

9名の HI 抗体陰性のドナーから末梢血リンパ球を

調製し NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに移植した。不活化 Narita 株をこのマウスに接種後、血清中に産生されるヒト抗 Narita HA 抗体価を測定した（図2）。すると、9名中6名のドナーを移植したマウスにおいて抗 HA IgG 抗体価が検出され、これらの末梢血細胞中に交差免疫記憶応答を示すリンパ球が含まれていることが明らかとなった。

(3)ヒト末梢血記憶B細胞とT細胞の分離

血清 HI 抗体価陰性のドナー末梢血単核球から、T細胞と記憶B細胞を分画した（図3）。T細胞は CD3 をマーカーとして、記憶B細胞は、CD27 と CD19 をマーカーとして使用した。

(4) H1N1pdm 不活化粒子に対する交差記憶応答における記憶B細胞の関与

T細胞と記憶B細胞、あるいはコントロールとしてT細胞のみを NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに移植した。不活化 Narita 株をこのマウスに接種後、血清中に産生されるヒト抗 Narita HA 抗体価を測定した（図4）。すると、記憶B細胞を移植したマウスにおいて抗 HA 抗体価が検出され、記憶B細胞分画に交差免疫記憶応答を示すリンパ球が含まれていることが明らかとなった。

D. 考察

本研究において、インフルエンザワクチンに対するヒト液性免疫記憶応答を再構築したヒト化マウスを作製することに成功した。この実験システムは、従来の *in vitro* 法と異なり、*in vivo* 免疫応答を指標とすることが大きな改良点である。そのため、従来法では不可能であった様々な *in vivo* 因子を包含した状態において、インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体産生機構の解析と有効性の評価が可能となる。

2009年に発生した H1N1pdm に対し、60歳以下のほとんどの人は血清学的にナイーブである。この

ようなナイーブな免疫系を賦活して中和抗体を誘導するためには、アジュバントの添加や複数回接種等が必要となることが H5N1 プレパンデミックワクチンの例で報告されている。しかし H1N1pdm ワクチンの場合、スプリットワクチンの単回接種でも、HI 抗体価や中和抗体価の有意な増加が認められることが判明した。最近の複数のグループの研究から、季節性インフルエンザウイルスにより誘導された CD4 陽性記憶 T 細胞が、新型インフルエンザウイルスに交差反応することが明らかにされている。また、新型インフルエンザウイルス罹患患者から HA に結合するモノクローナル抗体を作製したところ、季節性ウイルスの HA に交差反応性を示す抗体が含まれていたことから、季節性インフルエンザウイルスにより誘導された記憶 B 細胞の一部が交差反応する可能性が指摘されている。本研究でヒト化マウスを用いた実験系で検証した結果、少なくとも記憶 B 細胞の一部が新型ウイルスへの交差性に関与する事が確認された。今後、新型インフルエンザワクチン接種者において産生されたモノクローナル抗体を作製し、その中和活性や HA 結合部位を詳細に解析する事により、H1N1pdm ワクチンに特有な交差免疫記憶の原因メカニズムを明らかにする事が必要と考えられる。

E. 結論

ヒト末梢血リンパ球を移植したヒト化マウスを用い、インフルエンザワクチンに対するヒト液性免疫応答を評価する実験システムを構築した。このシステムを用い、新型インフルエンザウイルスに対するヒト交差免疫応答に記憶 B 細胞が関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
 - (1) 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
 - (2) 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* Nov 7. [Epub ahead of print] 2010
 - (3) 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.* 199, 1629-1637, 2009
- 学会発表
(千葉大G-COEシンポジウム、東京、2010年12月)
 - (1) 高橋宜聖 「Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs」
(第13回日本ワクチン学会、札幌、2009年9月)
 - (2) 高橋宜聖、小野寺大志、阿戸学、小田切孝人、田代真人、小林和夫 「ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザウイルス感染防御能の解析」

- (第39回日本免疫学会、大阪、2009年12月)
- (3) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖 「T cell-independent activation of memory B cells with B-2 phenotype by whole virus particles」
- (4) 加地友弘、杉本晶子、疋田正樹、饗場祐一、高橋宜聖、黒崎知博、竹森利忠 「Non-mutated memory B cells develop under T-cell help without germinal center reaction, followed by the functional maturation as immune response progresses」

- (第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月)
- (5) 高橋宜聖、阿戸学、二宮愛、長谷川秀樹、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人、小林和夫 「H5N1 (NIBRG-14) ワクチンの感染防御効果には、抗ヘマグルチニン抗体と抗ノイラミニダーゼ抗体の両者が関与する」

- (第38回日本免疫学会、京都、2008年12月)
- (6) 高橋宜聖、小野寺大志、加地友弘、北村弘、竹森利忠、小林和夫 「IgA+ memory B cells persist in the lung after an intranasal infection with influenza virus」

[国際学会発表]

- (第14回国際免疫学会、神戸、2010年8月)
- (1) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖 「T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling」
- (2) 疋田正喜、加地友弘、高橋宜聖、Klaus Rajewsky、竹森利忠 「IgG1 memory B cell compartment undergoes qualitative alteration

after its initial generation early in the immune response.」

- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図1 マウスに移植したヒトリンパ球の抗HA抗体産生応答

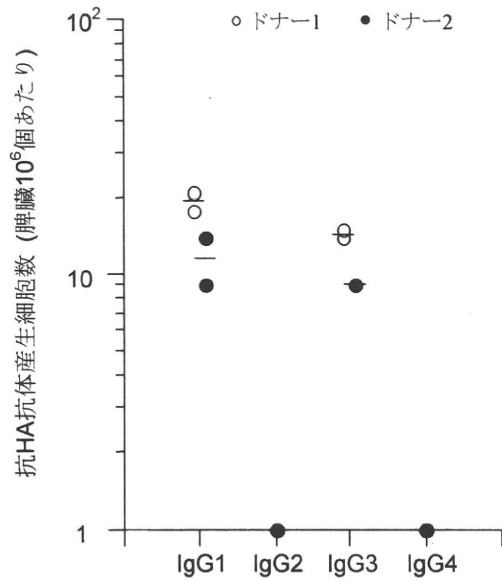


図2 マウスに移植したヒトリンパ球の交差液性記憶応答の測定

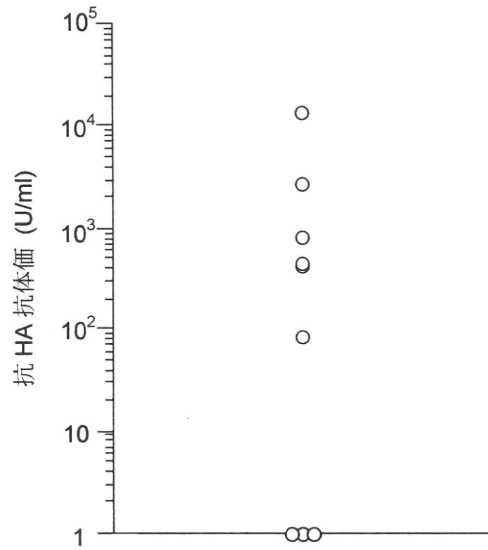


図3 ヒト末梢血記憶B細胞とT細胞の分画

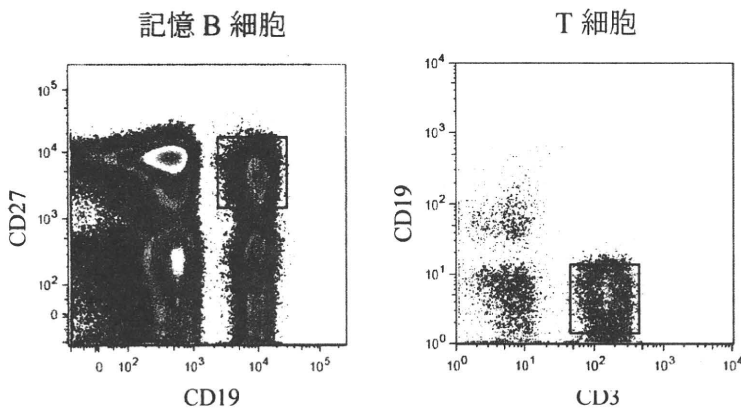
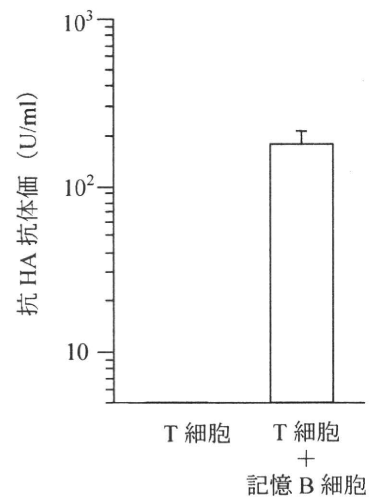


図4 記憶B細胞の交差反応性の測定



総合報告書

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

「新型インフルエンザウイルスの感染予防法の開発」

研究分担者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究協力者：相内章、鈴木忠樹、田村慎一、伊藤良、エリー・ヴァン・リート（国立感染症研究所）、奥野良信（一般財団法人阪大微生物研究会）、宮崎隆（東興薬品工業株式会社）、田中伸哉、澤洋文、坂井直樹（北海道大学）、安武義晃（産業技術総合研究所）、新井洋由（東京大学）、千葉丈（東京理科大学）、小淵正次（富山県衛生研究所）

研究要旨 流行株の予測が不可能な新型インフルエンザの予防の為には交叉防御能のある粘膜免疫を誘導するワクチンの開発が必須である。本研究では新型インフルエンザウイルスの流行に備えて粘膜免疫誘導の為の安全なアジュバント開発と経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの有効性に関する基礎的データの集める事を目的とした。免疫修飾物質として天然物由来のキノコ菌糸体抽出物のアジュバント作用について検討を行った。アジュバント作用が確認されたキノコ菌糸体抽出物について高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンでワクチン株だけでなく clade の異なるウイルス感染に対し防御効果が示された。またヒトの鼻腔洗浄液を用いた中和抗体価と HI 抗体価の測定に成功し、有効性の評価に有用である事が示された。

A. 研究目的

2009 年度初頭メキシコを発端とした豚インフルエンザ由来の新型インフルエンザ H1N1 が出現し瞬く間に世界流行を見せた。また高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパ、アフリカにまで広がりヒトに感染した場合に高い致死率をしめしている。新型インフルエンザはヒトが今まで感染の経験をしていない為に大流行する事が危惧されている。そ

の為感染前に感染による免疫と同様の免疫を準備する事により大流行を阻止する事が可能であると考えられる。その方法として経鼻インフルエンザワクチンがあるが不活化ワクチンにより効率よく粘膜免疫を誘導する為には安全で効果的な粘膜アジュバントが必要である。安全でより効率のよい粘膜免疫誘導方法を調べる目的で免疫修飾物質として天然物由来のキノコ菌糸体抽出物のアジュバント作用について検討を行った。更にヒトでの経鼻イ

ンフルエンザワクチンの有効性に関する判断基準の為の基礎データを作成することを目的とし、ヒト鼻腔洗浄液の回収法の確立と、鼻腔洗浄液中の中和抗体価および赤血球凝集反応阻止 (HI) 抗体価の評価系の構築を目的とした。

B. 研究方法

材料と方法:

ウイルス株及びワクチン株

インフルエンザウイルス株 A/VN/1194/2004 (H5N1)、及び A/PR8(H1N1)を用いてマウス感染実験を行った。また交叉防御の実験では A/PR8(H1N1)のスプリットワクチンを用いた。H5N1 のワクチン株としては NIBRG14 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

ウイルス感染

A/VN/1194/2004(H5N1) 株 及び A/PR8(H1N1)ウイルスを 1,000pfu を鼻腔内に接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL2 及び BSL3 動物実験施設でおこなった。

アジュバントの調整

経鼻粘膜ワクチンのアジュバントとして 12 種のきのこの熱性抽出物を用いた。陽性対照として合成二本鎖 RNA である poly(I:C) (東レ株式会社) をもちいた。

マウス

免疫実験及び感染実験に用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウス (メス) を用いた。

マウス免疫方法

6~8 週齢の BALB/c マウス(雌)を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 0.1~1 μ g のワクチンを 10 μ g のきのこ熱性抽出物アジュバント、と共に経鼻投与した。4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織 (NALT) および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

骨髄由来樹状細胞

野生株マウスおよび MyD88 欠損マウスの大腿骨から骨髄由来樹状細胞を準備した。G-CSF と共に培養し 5 日目に Lipopolysaccharide (1 μ g/ml), Zymosan (2 μ g/ml), *Phellinus linteus* (5 μ g/ml), *Macrolepiota gracilentia* (5 μ g/ml), *Lentinula edodes* (5 μ g/ml) or *Grifola frondosa* (5 μ g/ml) を添加し 6 日目に TNF- α を ELISA 法で測定した。

ヒトへのワクチン接種

成人ボランティア 5 名に 2009/10 シーズン季節性インフルエンザワクチンに含まれる A/Uruguay/716/07 (H3N2) の三倍濃縮スプリ

ットワクチン (45 µg HA/500 µl 接種) を 3 週間間隔で計 5 回経鼻接種した。なお本実験スケジュールは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。

採材とサンプル調製

ワクチン接種開始より 3 週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った。回収した鼻腔洗浄液の粗雑物の除去を行い、遠心濃縮チューブを用いて鼻腔洗浄液の濃縮を行った。

中和抗体価と HI 抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。段階的に希釈した血清あるいは鼻腔洗浄液と 100 TCID₅₀ (100 倍量の 50%組織培養感染量) のウイルスとの混合液を MDCK 細胞に添加し、3-4 日間培養を行った。顕微鏡を用いて観察を行い、各サンプルにおいてインフルエンザウイルスによる細胞変性効果のみられない最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

HI 抗体価の測定は、通常の赤血球凝集反応阻止試験により求めた。RDE 処理を行った血清あるいは鼻腔洗浄液を段階希釈し、4HA 価の七面鳥血球の添加 45 分後に、赤血球の凝集反応阻害がみられたサンプルの最大希釈倍率の逆数を HI 抗体価とした。

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に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。野性株マウスおよび 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- α 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- α 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- α 産生が減少した。全てのキノコ熱性抽出アジュバントは LPS や zymosan 同様に TNF- α や IL-6 を誘導したが IL-12 や p70 は誘導しなかった。

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。

経鼻ワクチンのヒトでの有効性

成人ボランティア 5 名に A/Uruguay/716/07 (H3N2) の三倍濃縮スプリットワクチンを 3 週間間隔で計 5 回経鼻接種 (45 μ g HA/500 μ l 接種) した。ワクチン接種開始より継時的に血清と鼻腔洗浄液を回収し、中和抗体価と HI 抗体価の測定を行った。接種回数に応じて中和抗体価および HI 抗体価が上昇することが示された。我々は、経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの接種において、鼻腔洗浄液又は血清において同等の有効性基準を満たすことが好ましいと考える。そこで、まず年齢制限を満たす被験者 4 名の血清 HI 抗体価を EMEA

の有効性判断基準に当てはめたところ、5 回目のワクチン接種後に HI 抗体価幾何平均値の条件を満たす (GMT ratio=2.83) ことが示された。また、この有効性判断基準を中和抗体価に当てはめた場合、4 回目のワクチン接種後に三つの条件を満たすことが明らかになった。

更に、鼻腔洗浄液の評価を行った。その結果、鼻腔洗浄液の総タンパク量を 1 mg/ml にした時に、生理的条件下にある IgA 抗体量 (約 2.21 mg/ml) の 1/10 量が含まれることが明らかになった。これに従い、得られた鼻腔洗浄液サンプルの総タンパク量を一律 1 mg/ml に調製した時の鼻腔洗浄液中の中和抗体価と HI 抗体価を測定した。鼻腔洗浄液の中和抗体価は、血清と比較してワクチン接種に伴い速やかに上昇することが示された。血清同様に、この中和抗体価を測定したところ有効性判断基準の三つの項目を満たすことが明らかになった。血清と同様に HI 抗体価は中和抗体価の値より 2-4 倍低い値で相関することが明らかとなった。

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。

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。

経鼻ワクチンのヒトでの有効性を調べる研究において、成人ボランティア 5 名に三倍濃縮スプリットワクチン (A/H3N2) を計 5 回、3 週間隔で経鼻接種 (45 µg HA/500 µl 接種) し血清および鼻腔洗浄液のワクチン原株に対する中和抗体価と HI 抗体価を測定した。経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの有効性を評価する基準は現存在しないが、少なくとも鼻腔洗浄液又は血清の抗体価の評価に現行の皮下接種型ワクチンの有効性判断基準が参考になる。得られた結果を評価基準に当てはめると、血清 HI 抗体価の幾何平均値のワクチン接種前後の比が 2.5 倍より大きいこと、の 1 項目を満たした。実際の有効性判断には 18-60 歳の健常被験者が最低でも 50 名必要とされるため、現在国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て、50 人規模での試験研究を既に開始し解析中である。また、中和抗体価と HI 抗体価の相関性は血清と鼻腔洗浄液で同じであることから、血清に対する判断基準をもとに、鼻腔洗浄液に関して HI 抗体価あるいは中和抗体価を測定することで有効性判断基準の作成が可能であることが考えられる。

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。

また経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの実用化に向けた有効性判断の為の基礎データ作成目指し、鼻腔洗浄液の評価系の構築と解析を試みた。鼻腔洗浄液の回収法かつ評価系の構築に成功し、世界で初めて鼻腔洗浄液によるウイルスの中和を示しその中和抗体価と HI 抗体価の測定に成功した。小規模ではあるが、経鼻粘膜投与型ワクチン接種により少なくとも現行の皮下接種ワクチンの有効性判断基準を満たす可能性が示された。上気道での感染防御には分泌型 IgA 抗体の働きが重要であり、鼻腔洗浄液中の中和抗体価が血清のそれと比較して早期に上昇すること等がヒトで示されたことから、経鼻噴霧型ワクチンの有効性判断基準を作成する上で重要な結果を得ることができた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushima S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged

- severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. **Am J Pathol.** 2008 Jun;172(6):1625-37.
2. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. **Mucosal Immunol.** 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
*corresponding author
3. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. **Expert Rev Vaccines.** 2008 Nov;7(9):1435-45.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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 intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. **J Med Virol.** 82:128-137, 2010.
8. 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.
9. 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.
10. 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.* 2010 Jan;63(1):67-71.
11. 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.
12. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki 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* 2010 Oct;82(10):1754-61.
13. 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.* 2010 Apr 23;5(4):e10256.
14. 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.* 2011 Jan;64(1):40-9.
15. 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.* 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内 章、田村 慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、

- 佐多徹太郎：キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第56回日本ウイルス学会総会（岡山）2008年10月
2. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進。第56回日本ウイルス学会総会（岡山）2008年10月
 3. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討。第56回日本ウイルス学会総会（岡山）2008年10月
 4. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、田村慎一、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カニクイザルを用いた効果検討。第12回日本ワクチン学会学術集会（熊本）2008年11月
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
10. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 11. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎 本邦初の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm)肺炎の剖検例 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 12. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉 新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した1剖検例 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 13. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 14. 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によるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 15. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 16. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 17. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS 発症マウスモデルにおける IFN- γ の投与効果 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 18. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデル

- ルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応について 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
19. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死的感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
20. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、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抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
21. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
22. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シヤペロン阻害剤による Tax と Tax 結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
23. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、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 月徳島
24. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
25. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
26. 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 第 14 回日

本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月

東京

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

「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」

1. 2007/2008 シーズンのわが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現頻度に関する研究
2. 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
3. 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

新型インフルエンザ出現時に十分量のワクチンが供給可能となるまでの期間の対応として抗ウイルス剤による重症化阻止、伝播リスクの軽減が必要となる。このため、一時的な抗ウイルス剤の大量使用による抗ウイルス剤耐性株の出現が懸念されている。平時に於ける抗ウイルス剤耐性のモニターの継続的实施は、モニター体制の維持とともに抗ウイルス剤に対する新たな耐性機構の解明に繋がる大変重要な課題である。

本研究では、国内外の季節性インフルエンザ分離株におけるノイラミダーゼ阻害剤耐性株の出現監視を行った。また、スペイン風邪以前の季節性インフルエンザ流行株の持っていた NA 亜型の一つであると考えられる N8 亜型 NA のノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性試験を馬由来 H3N8 亜型ウイルスを用いて行った。

A. 研究目的

パンデミックウイルス出現時には、抗ウイルス剤による重症化阻止、感染拡大の低減は重要な対策の一つとなる。一方で、短期間での抗ウイルス剤の多用は、耐性ウイルスの出現を引き起こす懸念がある。2009 年 4 月の Pandemic(H1N1)2009 ウイルスの出現以前には、世界的なオセルタミビル耐性 H1N1 株の流

行が大きな問題となっていた。このため、平常時から耐性株監視機構を機能させることは、新型出現時の抗ウイルス剤使用に重要な指針を与えると主に、耐性株出現機序の解明につながる重要な課題である。

我々は、平常時の耐性株の出現監視及び抗ウイルス剤使用による耐性株出現機序の解明のため、国内外の医療機関と連携し、過去

数年間に、ミャンマー、ベトナム、レバノン、ロシアや、国内各地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。また、新たなパンデミックウイルス出現時の抗ウイルス剤の効果を検討するため、現在ヒトの間で流行しているウイルスが持つNAと異なる亜型のNAのノイラミニダーゼ阻害剤(NAI)に対する感受性を調べた。

B. 研究方法

(1)2007/08 インフルエンザシーズンにインフルエンザ感染により北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎の一般医療機関を受診した患者を対象とし、初診時、再診時にウイルス分離を行った。

(2) 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、ウイルス分離を行った。

(3) 2007年から2008年にかけて国内で流行した馬インフルエンザ起因ウイルスであるH3N8亜型ウイルス13株を収集した。

(4)ウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列の決定、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。

(5)各ウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害剤であるOseltamivir 活性体(GS4071)およびZanamivirのノイラミニダーゼ活性50%阻害濃度は、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。

(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医療施設が所属する倫理委員会から調査の許可を得た。

C. 研究結果

1. 2007/2008シーズンのわが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現頻度に関する研究

1.1 国内におけるインフルエンザ初診時検体における耐性株の出現頻度

2007年12月～2008年4月の期間、北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎の14医療施設にインフルエンザ様疾患を訴えて受診した患者から、AH1N1亜型インフルエンザウイルス675株を分離した。

NA遺伝子の塩基配列とそれに基づく推定アミノ酸配列を決定して、NAタンパクについてはH274Yの変異の検索を行ったところ、3株について(0.4%)H274Yの変異が認められた。

分離株について、NAIアッセイを行ってGS4071およびZanamivirに対するIC₅₀を求めたところ、H274Y変異を持つ3株は予想通り高いIC₅₀値を示すことが明らかになった(表1)。H274Yの変異を持つ3株07N020, 07N035, 07K030はともに既知のNAI耐性株であるTexas/36/91のH274Y変異株であるTexas/36/91_V_40と同様にGS4071に対して高いIC₅₀値を示した(Texas/36/91_V_40;1.1 μ M, 07N020;1.2 μ M, 07N035;0.9 μ M, 07K030;0.9 μ M)。一方これらのウイルスのZanamivirに対するIC₅₀値には有意な変化は認められなかった。

1.2 ノイラミニダーゼ阻害剤服用後耐性株の発生頻度

NAI服用後の耐性株の発生頻度を求めるため、Oseltamivir服用患者38例、Zanamivir服用患者10例について服用後の検体からウイルスを分離して、耐性株の出現を検討した。

その結果、Oseltamivir服用患者一例の服用4日後の検体から耐性株(07K316-2)の出現が認められた。この株のOseltamivirに対するIC₅₀は、584nMであったが、Zanamivirに対するIC₅₀の変化は認められなかった。

2. 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

2.1 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。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、IC₅₀は59.7nM, 33.4nMであった(表2)。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。

2.2 2008-09年 国外におけるNAI耐性株の頻度について

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(表3)。H274Y変異H1N1株のオセルタミビルに対するIC₅₀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)、ベトナムは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。

3. 馬II型インフルエンザウイルスのNAI感受性について

2007年から2008年にかけて、国内で分離された馬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、推定アミノ酸配列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A/Equine/Miami/63(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耐性に関するアミノ酸置換の有無を検索したが、NAI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)を測定した。GS4071に対するIC₅₀は、07/08発生株とEq/Miami/1/63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、ザナミビルに対するIC₅₀は、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

2007/2008インフルエンザシーズンにおけるわが国でのAH1N1亜型インフルエンザウイルスのNAI耐性株の出現頻度が、欧米での流行に比べ比較的lowレベルであったことが明らかにされた。わが国は、世界有数のNAI消費国であり、NAI耐性株の出現の可能性が最も高いと考えられていたが、これまでの耐性株の流行様式や今回の調査の結果を考えると、NAI服用と耐性株の出現、流行頻度は一致せず、耐性株の出現、流行がNAI利用の選択圧のみでは説明しきれないことが示唆された。NAI耐性株の出現と流行の機序の解明には、疫学的情報のみならず、耐性株と野生株のウイルス学的な比較も重要であろう。

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。我々が見出した H3N2 亜型の耐性株は全く同じ NA の 136 位 Gln→Lys 変異を保持していた。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 type の Q136 のみが検出され、MDCK 細胞の培養後にはじめて K136 変異が検出され、培養により変異株が選択された可能性が示唆された。しかし、我々が見出した H3N2 株の K136 変異株は、MDCK 培養後と同様オリジナルの臨床検体中にも存在した。このため、今回認められた H3N2 亜型 Q136K 変異株は、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否かは不明である。

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搬感染を起こしているものと考えられる。

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。今回の調査では、レバノン、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、ベトナムとロシア(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。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。

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 亜型であることは、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発的なものであろうと考えられる。07/08 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。

E. 結論

2007/08 シーズンにおける治療前 Oseltamivir 耐性 H1N1 は調査地全体で 1% と低頻度であった。

NAI 治療後の耐性株は、Zanamivir 服用後では検出されず、Oseltamivir 服用後から 1 例検出された。

07/08 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、ベトナム、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。

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

1. Baranovich et al., Emergence of H274Y oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Japan during the 2008/2009 season. *Journal of Clinical Virology*, 47(1),23-28 (2009)
2. Tashiro et al., Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan. 1996-2007 *Antiviral Therapy*, 14(6), 751-761 (2009)
3. Dapat et al., Rare Influenza A (H3N2) Variants with Reduced Sensitivity to Amantadine and Zanamivir. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 493-6 (2010)
4. Zaraket et.al. Antiviral drug susceptibilities of seasonal human influenza viruses in Lebanon, 2008-09 season. *Journal of Medical Virology*, 82(7), 1224-8 (2010)

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