表1.　国内治療前検体から分離されたウイルスのノイラミニダーゼ阻害試験

検体	IC_{50}	
	GS4071 (nM)	Zanamivir (nM)
Texas/36/91 Parent	1.98	0.75
Texas/36/91 H274Y	1133.74	1.21
07N020	1253.9	2.44
07N035	937.84	1.06
07K030	901.22	1.35
Average ± SD	2.57± 0.97	1.81±0.66

表2.　Characteristics of subtype H3N2 viruses with Q136K mutation in NA and S31N substitution in M2

Strains	Passage history	NA mutation	IC_{50}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_{50} was calculated excluding the control viruses (n=47).

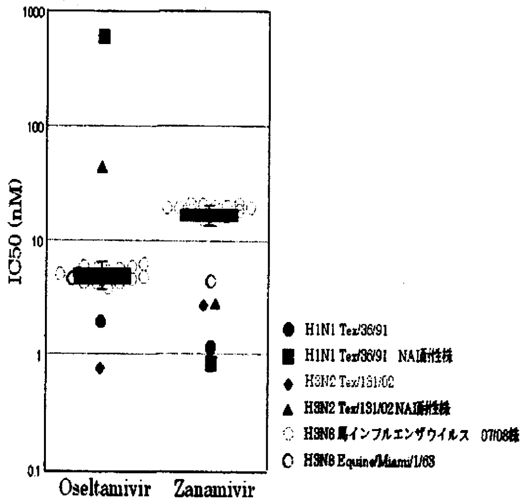
†Reference strains used as drug-sensitive and resistant control viruses in the NAI assay.

‡Amantadine sensitivity was based on M2 genotyping data

表 3　IC_{50} values in NA inhibition test with oseltamivier and zanamivir of influenza viruses isolated in three regions (Lebanon, Vietnam, and Russia)

Type/subtype	n	Oseltamivir IC_{50} (nM)	Zanamivir IC_{50} (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

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)



平成20-22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

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

ウイルス監視及び、迅速診断法の確立、リスク評価、国際協力

研究者分担者　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　氏家誠、小渕正次、岸田典子、島袋梢、望月菊、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、影山努、中内美名、
白倉雅之、板村繁之（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）
堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲（製品評価技術基盤機構(NITE)
バイオテクノロジー本部ゲノム解析部門）、
全国地方衛生研究所
齊藤玲子（新潟大学大学院医歯学系）

研究要旨　2007年11月頃から、オセルタミビルに対して耐性を示すA/H1N1亜型インフルエンザウイルスがEU諸国を中心に高頻度に分離され、その後世界中に広がったことを受け、国内における耐性株の発生状況を把握した。2007/08シーズンのA/H1N1耐性株の発生頻度は2.6%と諸外国に比べて極めて低かったが、2008/09シーズンの発生頻度は99.4%とわずか半年あまりで劇的に増加したことが分かった。一方、2009年4月以降、ブタ由来のA/H1N1インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm09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)を引き起こしたことから、A/H1N1pdm09ウイルスが本邦に上陸する前に、PCRを用いたA/H1N1pdm09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A/H1N1pdm09ウイルスの感染診断が実施できる体制の構築を行った。さらに、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た。

A. 研究目的

2007年11月頃から、ノイラミニダーゼ(NA)蛋白質の275番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシン(H275Y)に置換し、オセルタミビルに対して強い耐性となるA/H1N1亜型インフルエンザウイルスが、ノルウエーの67%を筆頭にEU諸国全体で20%以上の高頻度で検出されるようになった。このため、WHOグローバルインフルエンザサーベイランスネットワークから、NA阻害剤（NAI）耐性株サーベイ

ランスを強化し、各国における耐性株出現状況を報告するように要請された。これを受けて、本研究では地方衛生研究所（地衛研）の協力を得て、A/H1N1株を中心に国内で分離されたインフルエンザウイルスに対する耐性株サーベイランスを行った。

一方、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(A/H1N1pdm09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、A/H1N1pdm09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した。

さらに、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/型について評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 地衛研で分離されたインフルエンザウイルのうち、07/08シーズンに検体採取されたA/H1N1 = 1734株、A/H3N2 = 89株、B = 78株、08/09シーズンに検体採取されたA/H1N1 = 830株、A/H3N2 = 44株、B = 25株について解析を行った。

2. NA遺伝子解析：A/H1N1に関しては感染研、地衛研又はNITEでNA遺伝子の部分的なシークエンス又は全長シーケンスを行い各機関にてH275Yマーカーの同定を行った。A/H3N2及びB型に関しては、感染研又はNITEにてNA遺伝子の全長解析を行い、既知の耐性マーカーについて検索を行った。

3. NAI薬剤感受性試験：オセルタミビルまたはザナミビル存在下でNA-star kit (Applied Biosystem社)を用いて分離株の薬剤感受性試験を行った。

4. A/H1N1pdm09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。

5. 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（平均値歳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。

6. （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. 日本国内のA/H1N1耐性株発生状況

07/08及び08/09シーズンのA/H1N1耐性株の都道府県別発生状況を調べた。この結果、07/08シーズンは総解析数1734株中45株の耐性株が同定され、国内の耐性株の発生頻度は2.6%であった。わが国は世界一のオセルタミビル使用国にもかかわらず、当該シーズンは諸外国に比べるとその発生頻度は著しく低いことがわかった。耐性株が分離されたのは本州の10県であったが、鳥取県を除いた9県それぞれの発生頻度は、1.2～7.3%であった。一方、原因は不明だが、鳥取県では68株中22株が耐性株で、発生頻度は32.4%と突出していた。一方、08/09シーズンは状況が一変し、総解析数830株中825株にH275Y耐性マーカーが同定され、耐性株の発生頻度は99.4%であった。地域的に41の都道府県で耐性ウイルスが検出されており、各地におけるA/H1N1分離株のほぼ100%がオセルタミビル耐性であった。A/H1N1耐性株はわずか半年あまりで劇的に増加しており、全国的に広く蔓延していることが示唆された。

2. NAI 薬剤感受性試験

07/08 シーズンに分離された薬剤感受性株 240 株について、オセルタミビルに対する薬剤感受性試験を行った結果、薬剤感受性株のオセルタミビルに対する 50%NA 活性阻害濃度（IC50）の平均値は 0.09nM であった。一方、07/08 及び 08/09 シーズンに分離された国内耐性株のオセルタミビルに対する IC50 値は、おおむね 30.0nM 以上を示し、薬剤感受性株に比べて 300 倍以上もオセルタミビルに対して感受性が低下していた。これらの耐性株の殆ど全てはザナミビルに対しては感受性であったが、07/08 シーズンに鳥取県で分離された１株はオセルタミビル、ザナミビル両方に耐性であった。また、別の１株は、ザナミビルに耐性であった。

3. 耐性株の抗原性および遺伝子解析

07/08 及び 08/09 シーズンに国内で分離された耐性株は A/H1N1 ワクチン株（A/ブリスベン/59/2007）と殆ど同じか 4 倍以内の抗原変異に収まり、抗原性はワクチン株に類似していた。一方、耐性株の NA 遺伝子の系統樹上では、クレード２B（アミノ酸マーカー:H45N、G249K、T287I、K329E、G354D）に分類され、海外から移入された可能性が示唆された。

4. A/H3N2亜型およびB型インフルエンザウイルスに対するNAI耐性株

07/08及び08/09シーズンに国内各地で分離された、A/H3N2=89株。B型=78株（07/08シーズン）及びA/H3N2=44株、B型=25株（08/09シーズン）についても、オセルタミビル及びザナミビルに対する薬剤感受性試験を行った。この結果、08/09シーズンに分離されたA/H3N2の２株はザナミビルに対して30倍程度感受性の低下が確認されたが、その他の株は全て両薬剤に対して感受性であった。

5. A/H1N1pdm09 ウイルス検出診断系の緊急構築と地衛研への緊急配備

2009 年 4 月 30 日の国内に A/H1N1pdm09 ウイルスが侵入する前に、米国 CDC から提供された遺伝子配列情報を元に設計した 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 カ所の地衛研および 15 カ所の検疫所に緊急配備した。また、A/H1N1pdm09 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安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。その後、米国 CDC から入手したカリフォルニア株で追検証し、今回構築した検出系の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、A/H1N1pdm09 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した。

6. A/H1N1pdm09 ウイルスによるワクチンの評価。

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。

7. A/H3N2 ウイルスによるワクチンの価。

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。

8. 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

07/08 シーズンに国内で分離されたオセルタミビル耐性 A/H1N1 株の発生頻度は、わずか 2.6%だったが、08/09 シーズンに入り 41 都道府県から耐性株が分離され発生頻度は 99.4%（830 株中 825 株）となった。このことから、わずか半年あまりで国内においても A/H1N1 耐性株が劇的に増加している事がわかった。一方、A/H3N2 および B 型インフルエンザウイルスに対して明確な耐性を示す株は確認されていない。また、07/08 及び 08/09 シーズンに分離された A/H1N1 国内耐性株は今期のワクチン株 A/ブリスベン/59/2007 に遺伝的にも抗原的にも類似しているため、ワクチンは有効であると考えられる。これに加えて、耐性株の殆ど全てはザナミビルに対しては感受性であることから、ザナミビルによる治療も有効であることが示された。我が国では、900 万人分のオセルタミビルと 300 万人分のザナミビルが 08/09 シーズンに向けて準備されている。従って、本インフルエンザ NAI サーベイランスは、わが国のインフルエンザ対策にとって有用な情報を提供し、極めて重要な役割を担っている。

一方、2009 年の A/H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミック発生前に、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスを対象ではあったが、検疫所および地衛研に対して、トレーニングコースを開催し技術移転が完了していたために、パンデミック発生の際は、地衛研および検疫所に 1 週間で A/H1N1pdm09 ウイルスの検査体制を緊急配備することができた。これは、

世界に類を見ない迅速な新型インフルエンザ対応の成功例となった。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。また、海外からの検査依頼にも対応し、国際貢献ができた。

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

・07/08 シーズンの A/H1NA 耐性株の発生頻度は 2.6%と極めて低い状況であったが、08/09 シーズンには発生頻度が 99.4%となり、わずか半年あまりで劇的に A/H1N1 耐性株が増加している事がわかった。また、A/H3N2 亜型及び B 型は現時点で、高頻度の耐性株の発生は確認されなかった。

・A/H1N1pdm09 ウイルスがわが国に侵入する前に、地衛研および検疫所へリアルタイム PCR 検査系の緊急配備に成功した。

・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。

・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。

・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. 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 Infl uenza Virus Surveillance in Japan Oseltamivir-Resistant Infl uenza 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, Tochihara 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: Temporaland Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan. PLoSONE 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 Sriwilaijaroena,b, AkioKadowakic, YurikoOnishic, NobukiGatoc, MakotoUjike, TakatoOdagirid, MasatoTashiro, Yasuo Suzuki Mumefuralandrelated HMF derivatives from Japanese apricot fruitjuice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemicin fluenza 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

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
Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri　Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. J. Virol.82, 728-739, 2008
H Kamijuku, Y Nagata, X Jiang, T Ichinohe, T Tashiro, K Mori, M Taniguchi, K Hase, H Ohno, T Shimaoka, S Yonehara , T Odagiri , M Tashiro, T Sata, H Hasegawa and K-i Seino. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alfa-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. Mucosal Immunol. 1, 208–218 (2008).
Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ.　The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. Science. 2008 Apr 18;320(5874):340-6.
Keiichi Makizumi, Kazuhiko Kimachi, Katsuhiko Fukada, Tomohiro Nishimura, Yasuhiro Kudo, Shuro Goto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoichiro Kino　Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003–2004 epidemic strain may have been possible using Madin–Darby canine kidney cells.　Vaccine, 26, 6852-6858, 2008

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、小渕正次、田代眞人、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、小渕正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代眞人：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、小渕正次、氏家誠、田代眞人、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、小渕正次、大場邦弘、許斐奈美、小田切孝人、田代眞人、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.

Takato Odagiri　Antiviral resistance surveillance of influenza viruses in Japan. Workshop on antiviral resistance monitoring, The 2nd Meeting of National Influenza Centers in the Western Pacific and South East Asia Regions, Tokyo, Japan, 21-24 April 2008.

Takato Odagiri　Influenza surveillance in Japan.　The 2nd Meeting of National Influenza Centers in the Western Pacific and South East Asia Regions, Tokyo, Japan, 21-24 April 2008.

長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代眞人、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、岡山、10 月（2008）

池野大介、来海和彦、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代眞人、城野洋一郎　BALB/c マウスを用いたパンデミックワクチン投与法の検討　第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月（2008）

氏家誠、小渕正次、影山努、白倉雅之、岸田典子、島袋梢、望月菊、堀川博司、加藤裕美子、山田隆一、藤田信之、田代眞人、小田切孝人　2007/08 シーズンに分離された H275Y マーカーをもつインフルエンザウイルス A/H1N1 オセルタミビル耐性株の国内発生状況　第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月（2008）

川上千春、小渕正次、氏家誠、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代眞人　横浜市におけるオセルタミビル耐性 A/H1N1 型インフルエンザウイルスの解析　第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月（2008）

小渕正次、氏家誠、板村繁之、影山努、白倉雅之、原田勇一、岸田典子、堀川博司、加藤裕美子、細山哲、原田健史、矢代勲、山田隆一、藤田信之、小田切孝人、田代眞人　2007/08 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 20 年度のワクチン株　第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月（2008）

牧角啓一、来海和彦、深田勝彦、西村知裕、工藤康宏、後藤修郎、小田切孝人、田代眞人、城野洋一郎　ワクチン製造用無血清培地浮遊培養 MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性および性状解析　第 56 回日本ウイルス学会、

岡山、10月 (2008)
岸田典子、影山努、白倉雅之、今井正樹、中村雅子、石崎徹、山岡政興、押部智宏、稲元哲朗、島津幸枝、千々和勝巳、小田切孝人　国内に飛来する野生水禽が保有する鳥インフルエンザウイルスの調査　第56回日本ウイルス学会、岡山、10月 (2008)
高橋宣聖、阿戸学、二宮愛、長谷川秀樹、小田切孝人、佐多徹太郎、田代眞人、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12回日本ワクチン学会、熊本、11月 (2008)
河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代眞人、多田善一、城野洋一郎、池田富夫、五反田亨　新型インフルエンザワクチンの効果判定の指標としての抗体価測定法 (HI試験及び中和試験) の再現性と感度の比較　第12回日本ワクチン学会、熊本、11月 (2008)
長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典子、田村慎一、小田切孝人、田代眞人、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、熊本、11月 (2008)
小田切孝人　新型インフルエンザワクチン　第12回日本ワクチン学会、熊本、11月 (2008)
小田切孝人　新型インフルエンザの脅威とその対策　第22回九州免疫血清研究会、大分、11月 (2008)
小田切孝人　新型インフルエンザ対策とH5N1プレパンデミックワクチン開発　沖縄感染免疫シンポジュウム、沖縄、11月 (2008)

G.　知的所有権の出願・登録状況

なし

平成20-22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

「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
(新型インフルエンザ対策のウイルス学的評価、リスク評価)

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：古瀬祐気、島袋梢、貫和奈緒、小田切崇、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：「A型インフルエンザウイルス（H3N2）薬剤耐性遺伝子の獲得機序」

2005年以降、アマンタジン耐性インフルエンザウイルスが流行していたが、2007-2008インフルエンザシーズンより感受性株が主流となった。ウイルスの全シークエンスを決定したところ、薬剤感受性株は過去の耐性株と遺伝子再構成（リアソートメント）によって作られた可能性が示唆された。

研究2：「オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランス」

2008-2009年インフルエンザシーズンにおいて、仙台市内の5小児科医療施設を定点としたインフルエンザウイルスのサーベイランスを行った。仙台市内での流行の主流であったA(H1)型は、100%タミフル耐性遺伝子型であった。

研究3：「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」

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4：「仙台市内における薬剤耐性インフルエンザA(H1N1)ウイルスの発生動向調査」

仙台市内で流行した新型インフルエンザウイルスおよびからオセルタミビル、ナザミビル投与後の患者から分離されたウイルスより両薬剤耐性ウイルスの検出を試みたが、NA遺伝子の同定および薬剤耐性試験において確認できず、耐性株の流行は確認できなかった。

研究５：「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」

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る。

研究１：「A型インフルエンザウイルス（H3N2）薬剤耐性遺伝子の獲得機序」

古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁

【背景】

インフルエンザウイルスは呼吸器感染症の主要な一因であり、毎年の流行を引き起こす。治療薬のひとつとしてアマンタジンがあるが、2000年以降この薬剤に対する耐性株の出現・増加が世界中で報告されてきている。これら多くの耐性株はM2遺伝子の31位に特徴的な変異（S31N）を有している。

2005年以降、抗原性を司るHA遺伝子にある特徴的なアミノ酸変異を持つ株の一群が出現した。さらに興味深いことに、この変異をもつ株のほぼ全てがS31NをM2遺伝子に持っていた。これらの変異を持つ薬剤耐性株は世界中に広まっていったが、それが薬剤耐性能

によるものであるのか、HA遺伝子上の変異によって抗原性が変異したためであるのか、あるいはHA遺伝子とM2遺伝子上の変異の組み合わせがウイルスにとって、未知のメカニズムによって、有利なものであったためなのかは明らかでない。そこで本研究ではこれらの株が、その後どのように変異していくのかを遺伝的に追跡した。

【方法】

2005年から2007年の間に、仙台および福岡から集められたインフルエンザ分離検体223件から抽出された66件について解析を行った。ウイルスはMDCK細胞によって分離され、RNA抽出後RT-PCRを行い、塩基配列を同定した。系統樹は近隣接合法によって作成した。

【結果】

研究期間中、77%の株が薬剤耐性の変異を有していた。HA遺伝子に基づく系統樹を作成したところ、上述した特徴的な変異を持つグループ（以後、N-lineageと呼ぶ）とそうでないグループに分けられた。2005-2006シーズンでは、既存の報告の通りN-lineageに含まれる全ての株が薬剤耐性変異を有しており、他方のグループは薬剤感受性であった。しかしながら2006-2007シーズンになると、すべての株はN-lineageに分類されたものの、薬剤耐性のものと感受性のものの両者があった。この新たに見つかった薬剤感受性のN-lineage株について、どのように出現したのかさらに詳細な解析を行った。遺伝的距離を算出したところ、この株のHA遺伝子は前シーズンのN-lineage（薬剤耐性）のものに近かったが、M遺伝子は他方のグループのものに近かった。この結果から、この薬剤感受性N-lineage株は遺伝子再構成（リアソートメント）によって作られた可能性が示唆された。そこで、ほかの遺伝子についても同様の解析を行った。結果、HAとM以外の遺伝子についても、前シーズンのN-lineageから引き継がれたと考えられる遺伝子と、他方のグループから引き継がれと考えられる遺伝子が組み合わさっていた。

【考察】

本研究によって、薬剤耐性の変異を持っていたN-lineage株がリアソートメントによって、薬剤感受性のM遺伝子を新たに獲得していたことが明らかになった。そもそも、薬剤耐性のN-lineage株もリアソートメントによって出現したものであることが既に報告されており、さらなるリアソートメントを今回起こしたことになる。薬剤耐性を獲得したり、あるいは喪失したりすることが、自身のM遺伝子に変異を引き起こすのではなく、他者からM遺伝子を導入することによって起こっていることは大変興味深い。また、さらなるリアソートメントによって薬剤感受性になったことは、薬剤耐性能や変異の組み合わせが、N-lineageが世界中に広まった原因ではない可能性を示唆しているといえる。

研究2:「オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランス」

古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁

【背景】

2007-2008インフルエンザシーズンにて、オセルタミビル耐性ウイルスが鳥取および横浜で複数検出されたが、全国的な流行まで至らなかった。しかし、2008年の南米、南アフリカやオーストラリアなど南半球でのインフルエンザ流行において、耐性ウイルスの検出頻度が25%を越える地域もあり、本邦への波及が予想される。そこで、2008-2009インフルエンザシーズンに、仙台市内でのインフルエンザ流行における耐性ウイルスのサーベイランスを行うと同時に、抗インフルエンザ薬投与による治療効果およびウイルスの排泄量等の検討を行った。

【方法】

2009年1月1日以降、仙台市内の５つの開業小児科医療施設においてインフルエンザ迅速診断キット陽性であった患者より咽頭拭い液および鼻腔拭い液を採取し、ウイルス分離およびウイルス学的解析を行

った。ウイルス分離はMDCKを使用し、同定は赤血球凝集阻止試験を行った。ウイルス学的解析として、HA1 領域（抗原決定部位）、NA(オセルタミビル作用部位)、M（アマンタジン作用部位）の塩基配列を同定した。また、抗インフルエンザ薬の投薬の有無、臨床データも同時に収集した。

【結果】

2009年1月1日から2月28日までに、合計336検体が採取され、A(H1)が145株、A(H3)が6株、Bが53株分離された。今シーズン仙台市内で流行したA(H1)は北欧系統に属しており、NAおよびM2のシーケンスによりすべてがオセルタミビル耐性であったがアマンタジンには感受性株であった。2月28日現在、仙台市内でインフルエンザが流行しており、引き続き検体採取を行っている。

【考察】

2007-2008 シーズンの仙台市内では、検討したすべての A(H1)分離株においてオセルタミビル感受性、アマンタジン耐性であった。しかし、2008-2009 シーズンの株は、南半球の流行を反映し、すべてオセルタミビル耐性であった。B 型も流行しており、今後すべてのウイルスの型を対象にノイラミニターゼ活性を測定し薬剤耐性の確認を行う。経過中、複数回検体を採取している症例もあり、インフルエンザの流行が終焉した時点で、これらの臨床経過およびウイルス量等の解析を行い、耐性ウイルスが検出された患者における抗インフルエンザ薬の効果を検討する予定である。

研究3：「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】

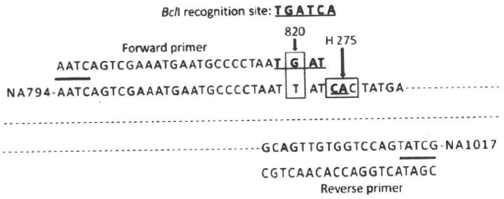
新型インフルエンザは、2009年のはじめより北アメリカから世界各国に感染拡大した。このように急速に感染拡大する状況下ではワクチンの生産が間に合わなかったため、抗インフルエンザ薬の役割が期待された。過去にあまり使用経験が無い途上国も含め、多くの国や地域において使用された。しかし、処方量が増えると同時に、耐性ウイルスの出現が危惧される。2010年3月現在、全世界で267株のオセルタミビル耐性ウイルスの散発例の報告に留まっているが、2007ー2008年シーズンにおいて季節性インフルエンザの耐性ウイルスが短期間で世界各地に広がったとことより、今後薬剤耐性新型インフルエンザが流行株となる可能性が考えられる。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、ノイラミタ一ゼ阻害試験やNA遺伝子のシークエ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か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 *BclI* 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 *BclI* 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 μL を制限酵素 *BclI*(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くださった「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くだ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4:「仙台市内における薬剤耐性インフルエンザ A(H1N1)ウイルスの発生動向調査」

島袋梢、小田切崇、貫和奈緒、古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁

【背景】

2009 年 4 月にメキシコで報告されたブタ由来のインフルエンザ A(H1N1)ウイルス(以後 A(H1N1)pdm)の人への感染は、瞬く間に世界中に拡大した(MMWR, 2009)。分離株の解析より、M2タンパク阻害薬であるアマンタジンに対して耐性をもっているが、幸いな事にノイラミニター阻害薬であるオセルタミビルおよびナザミビルに対して感受性を持っている事が確認された(MMWR, 2009)。しかし、投薬された患者から散発的に薬剤耐性ウイルスの検出が報告されるようになった(Baz M et al., 2009)。季節性 A(H1N1)ウイルスにおいては、2007/2008 シーズンでは日本国内数%であった耐性ウイルスの出現頻度が、2008/2009 シーズンではほぼ 100%になるなど、非常に速いスピードで耐性ウイルスへ移行しており(Lackenby A et al., 2008)、今後 A(H1N1)pdm 薬剤耐性株の流行が懸念されている。

【目的】

仙台市におけるオセルタミビルおよびザナミビル耐性 A(H1N1)pdm の発生動向を調査する。

【方法】

2009 年 8 月 1 日から 12 月 31 日までに、仙台市内の 2 つの小児科外来施設において、インフルエンザ様症状を呈し迅速診断キット陽性であった患者より検体を採取し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。細胞変性効果が確認され、赤血球凝集試験陽性であった培養上清から RNA を抽出し、complementary DNA を作成し、全 HA 遺伝子、NA 部分遺伝子を増幅し(NITE/NIID, 2009)、同部位の塩基配列を同定した。また、一部検体については、我々が考案したオセルタミビルの耐性遺伝子マーカーである H275Y を検出する Restriction Fragment Length Polymorphism

(Nukiwa N, et al., 2010)）をもちいた耐性株のスクリーニングを行った。また、同2施設において、タミフルもしくはザナミビル服用後患者より分離された10株について、前述の方法でのスクリーニングおよび、OseltamivirおよびZanamivirに対する薬剤感受性試験(IC50測定)を行った。

【結果】

仙台市では、定点あたりのインフルエンザ報告数のピークは第35週から39週、42週から53週までの二つが確認された。研究期間中に分離された213株のうち、無作為抽出した116株を対象としHA遺伝子の全塩基配列を同定した。Nelson等が提唱した参照株と比較したところ、仙台市内の株はClade7に属しており(Nelson M, et al, 2009)、時間の経過とともに変異が蓄積されていることが確認された。無作為抽出した32検体において、NA遺伝子の全塩基配列を同定したが、他の薬剤耐性マーカー(Hurt AC, et al., 2009)も含め確認できなかった。RFLPを用いた大量スクリーニングでは、検討133検体すべてがH275とオセルタミビルの耐性遺伝子変異を持っていなかった。ノイラミニターゼ阻害薬服用後の患者から分離した10株は、耐性遺伝子マーカーは陰性で、かつ両ノイラミニターゼ阻害薬のIC50も感受性のパターンであった。

【考察】

生産される抗インフルエンザ薬の約70%を使う本邦では、新型インフルエンザ流行に伴い薬剤耐性ウイルスの流行が危惧されている。2009年12月現在の流行中期までのデータでは、日本国内でのオセルタミビル耐性インフルエンザの検出頻度は1.6%と低い。今回の仙台市内での流行全期間で行った調査においても同耐性ウイルスが1例も確認されなかった。また、オセルタミビルの小児への投与が行われていない現状を踏まえ、ザナミビル耐性株にも注目したが、すべて感受性であった。低い検出頻度を想定し、投薬患者からの耐性ウイルスの検出も試みたが、すべて感受性であった。インフルエンザにおいては、quasi-species(Hurt AC, et al., 2009, Chen H et al.,2009)も充分考慮する必要があるが、今回の検出方法ではクローニングをまでおこなっておらず、その可能性を十分検討しきれていない。今後はモニタリングと同時に、発生機序についても検討していく　。

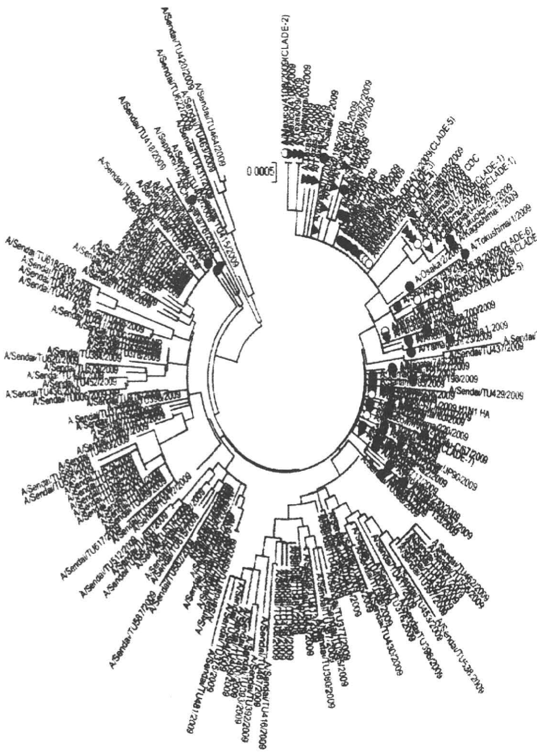


図1 仙台市内で分離されたA(H1N1)pdm
HA全遺伝子を用いた系統樹
● 国内参照株、▼海外参照株

研究5：「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RDEⅡ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

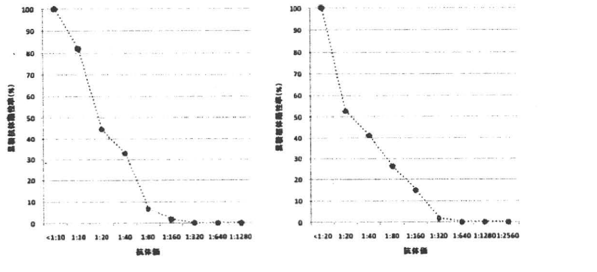
抗体調査

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継時変化をみてみると、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、抗体価の継時変化をみると 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,; Wiliams 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、通常の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 & Evaluation, May 2010;10(4):569-74

Furuse Y, et al. Reversion of Influenza A(H3N2) from Amantadine-resistant to Amantadine-sensitive by Further reassortment in Japan during the 2006-2007 Influenza Season. Journal of Clinical Microbiology 2009, vol.47, No3, p841-844

Furuse Y, et al. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. Virology Journal 2009 29;6:6

Oshitani H, Kamigaki T, Suzuki A. Major issues and challenges of influenza pandemic preparedness in developing countries. Emerg Infect Dis. 2008;14:875-80.

【和文】：なし

2．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

古瀬祐気 他、Mixed infection of influenza A viruses is common, 14th International Congress on Infectious Disease, March 2010,Miami, Florida

Y.Furuse, A.Suzuki, T.Kamigaki, M.Saito, N.Fuji, H.Galang, S.Lupisan, R.Olveda, H.Oshitani 「Genetic Variation and Prevalence of Amantadine-Resistant Influenza A (H3N2) Viruses in Two Consecutive Seasons in Japan and the Philippines」、『The 13th International Congress on Infectious Diseases』、No.16.044、Kuala Lumpur、Malaysia、(June 2008)

Y.Furuse, A.Suzuki, N.Fuji, M.Shimizu, H.Galang, J.Bajaro, S.Lupisan, A.Bautista, V.Arguelles, R.Olveda, H.Oshitani 「Genetic Variation and drug (amantadine) resistance of Influenza A virus (H3N2)in the Philippines and Japan」、『Launching of Tohoku-RITM collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases』、No.2、Muntinlupa City, The Philippines、(October 2008)

古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁 「Genetic Variation and Prevalence of Amantadine-Resistant Influenza A (H3N2) Viruses in Two Consecutive Seasons in Japan」、『第22回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム』、東京、2008年5月

【国内学会】

古瀬祐気、「アマンタジン耐性株の進化様式への考察」第23回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム

古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁、「仙台市内で流行したインフルエンザウイルスの薬剤耐性」、『第205回日本小児科学会宮城地方会』、仙台、2008年6月18日

古瀬祐気、鈴木陽、押谷仁「A型インフルエンザウイルス (H3N2) 薬剤耐性遺伝子の獲得機序」、『第9

回 感染病態シンポジウム』、No. 2、仙台、2008 年 7 月

古瀬祐気、鈴木陽、神垣太郎、斎藤真理子、押谷仁「A 型インフルエンザウイルス（H3N2）薬剤耐性遺伝子の獲得と遺伝子組み換え」、『第 56 回日本ウイルス学会学術集会』、2E02、岡山、2008 年 10 月

鈴木陽、齊藤麻理子、藤直子、清水みどり、押谷仁小児インフルエンザ罹患者の便からのインフルエンザウイルスの検出」、『第 206 回日本小児科学会宮城地方会』、仙台、2008 年 11 月 8 日

古瀬祐気、「季節性インフルエンザウイルス A(H1N1)薬剤耐性遺伝子と リアソートメント」第 63 回日本細菌学会東北支部総会

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