

201028037A

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

地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性  
インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の  
改良および流行把握に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成23（2011）年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

研究代表者： 小田切孝人 \_\_\_\_\_ P1

### II. 分担研究報告

1. インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

皆川洋子 \_\_\_\_\_ P9

研究協力者：池田辰也、水田克己、長島真美、新開敬行、林志直、加瀬哲男、高橋和郎、戸田昌一、調恒明、吉富秀亮、千々和勝己、駒込理佳、長野秀樹、川上千春、小渕正次、滝澤剛則、内野清子、田中智之、平良勝也、山下和予、安井善宏

2. リアルタイム PCR 法を用いた H275Y オセルタミビル耐性株の検出系の構築について

影山努 \_\_\_\_\_ P15

研究協力者：中内美名、高山郁代

3. 薬剤耐性パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスの検出と新規承認薬剤を含む感受性試験成績について

高下恵美 \_\_\_\_\_ P22

4. 地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

齋藤玲子 \_\_\_\_\_ P26

研究協力者：鈴木康司、鈴木宏

5. 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析

藤田信之 \_\_\_\_\_ P32

6. インフルエンザウイルス蛋白質の機能的構造変化解析系の構築と変化予測

佐藤裕徳 \_\_\_\_\_ P39

研究協力者：横山勝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P43

### IV. 研究成果の刊行物・別刷（別添）

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）

総括研究報告書

地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

研究代表者 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

研究要旨

全国地方ブロックごとのコア地衛研6機関およびサポート地衛研5機関からなるコア・サポート地衛研を組織し、感染研との迅速な連携体制を導入した。この連携をもとにした共同研究から、新規にオセルタミビル耐性マーカーH275Y変異を捉えるTaqManPCR法を開発し、全国地衛研へ技術移転し、新型インフルエンザA/H1N1pdm09ウイルスの薬剤耐性株サーベイランスを実施した。また、流行株のNA、M遺伝子の大量解析から各亜型・型ウイルスの性状を分析した。さらに、ワクチン株の孵化鶏卵での製造過程で生じるHA蛋白質の変化を構造レベルで解析し、2009年のA香港型とB型のワクチン原株のHAは、鶏卵での馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることを明らかにした。

研究組織

研究代表者

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

藤田信之

佐藤裕徳

系講師

製品評価技術基盤機構  
バイオテクノロジー本  
部・次長

国立感染症研究所病原  
体ゲノム解析研究セン  
ター室長

研究分担者

皆川洋子

愛知県衛生研究所所長

影山努

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2室室長

高下恵美

国立感染症研究所イン  
フルエンザウイルス研  
究センター主任研究官

齋藤玲子

新潟大学大学院医歯学

A. 研究目的

2009年4月からブタ由来のインフルエンザA/H1N1ウイルス(A/H1N1pdm09)が世界的に蔓延し、1968年のA/H3N2及び1977年のA/H1N1以来、30数年ぶりのパンデミックが起こった。わが国では、2009年5月初旬に成田検疫所一

国立感染症研究所（感染研）検査チームにより A/H1N1pdm09 初発例が検出されて以来、その後各地で散発的に検出されるようになり、8 月からは全国的な大流行へと突入していった。国内でのパンデミック発生初期では、A/H1N1pdm09 ウイルスが各地に侵入する前に、各自治体では診断検査系の準備が完了し、わが国のインフルエンザ検査サーベイランス体制は世界に類を見ない迅速な対応として、諸外国から高い評価を得た。この初動対応の成功の背景には、パンデミック発生 9 カ月前に感染研における地方衛生研究所（地衛研）への PCR 検査技術研修が実施されていたこと、感染研—地衛研情報交換網が構築され、検査、サーベイランス体制の強化が既に進められていたことがあり、感染研—地衛研間での連携は緊急対応ばかりでなく、今後の株サーベイランスの効率化とレベルの向上にとってもひじょうに重要であることが再認識された。

インフルエンザ株サーベイランスを実施している地衛研は現時点で 77 ヶ所あるため、感染研から個々の地衛研にそのつど情報発信や新規技術移転をすることは、効率が悪く多くの時間を必要とする。このため、各地方ブロックからコア機能を果たす 6 ヶ所の地衛研およびそれを補佐する 5 ヶ所のサポート地衛研からなるコア・サポート地衛研組織を構築し、感染研との連携体制の導入をはかった。本研究では、コア・サポート地衛研—感染研連携の新企画として、これまで継続してきた薬剤耐性株サーベイランス系の改良を行った。これには、感染研で新規に耐性株マーカー遺伝子変異を捉える TaqMan PCR 法を開発

し、それをコア・サポート地衛研で事前評価し、問題点を感染研にフィードバックし、それを踏まえたマニュアルの修正、標準化を行い、その後に全国地衛研への技術移転するという、これまで実施したことのない密な共同研究体制による薬剤耐性株サーベイランスを実施することが、目的の一つである。

一方、本研究では、流行株の遺伝子解析から流行ウイルスの系統的トレンドを把握し、次シーズンの主流となる流行株の予測、および高病原性発現につながるハイリスク変異株の早期検出、ウイルス遺伝子の機能的解析法の開発による流行ウイルスの変化予測システムの構築を目指す。また、国民のインフルエンザワクチン接種後の抗体保有状況を把握することによってワクチンの効果検証と次シーズンの流行規模予測への情報提供をする。

このように本研究では、研究開発の成果を速やかにサーベイランスの現場に反映させたサーベイランス体制の強化と質の向上をはかり、さらに、新規遺伝子解析技術の開発研究により、流行予測精度を向上させることにより、適切なワクチン株選定を可能とさせる。

## B. 研究方法

1. 地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症部会と連携し、レファレンスセンター（コア地衛研）6 機関に加え、助言者（サポート地衛研）5 機関 計 11 機関が研究協力者として参画したコア・サポート地衛研組織を構築した。
2. 従来のノイラミニダーゼ（NA）部分シー

ケンス法に代わる TaqManPCR 法を導入した薬剤耐性株 H275Y 検出系を構築した。コア・サポート地衛研による事前検証と標準マニュアルの作成および全国地衛研への技術移転、耐性株サーベイランスを実施した。

3. 新規承認薬剤を含む薬剤感受性試験系の構築と H275Y マーカーを持つ耐性株の感受性試験と情報公開を行った。
4. 高齢者施設の医療従事者と入所者、一般病院の従事者の A/H1N1pdm09 ウイルスに対する抗体保有調査を実施した。
5. 流行株の NA 遺伝子および M 遺伝子の新開系統樹解析に基づいた、流行株の性状解析と流行予測を実施した。
6. コンピュータシミュレーションによるウイルス HA 遺伝子の変異、構造、機能、進化解析を実施した。

## C. 結果

1. TaqManPCR によるオセルタミビル耐性マーカー H275Y の検査系の構築、特異性・検出感度の検証

陽性コントロール RNA を用いて、様々な組み合わせのプライマー&プローブを検討し、最も良く耐性株と感受性株を識別でき、高感度に検出する系の構築に成功した。また、検出系をより簡便にするために、RNA 抽出を行わずに、感染細胞の培養上清を直接リアルタイム RT-PCR 反応液に加えるための条件検討をし、RNA 抽出無しで実施できる PCR 法を確立した。

2. 全国地衛研が所有する様々な機器への最適化  
耐性遺伝子検出系の構築には、Roche

Lightcycler 480II を用いて検討を行ったが、全国地方衛生研究所での実施にあたり、他の検出機器での本検出法の有用性の検討と最適化を行った。これによって、ABI 社では 5 機種、3 種類の解析ソフト、また Agilent 社では 1 機種、1 種類の解析ソフトが使用可能となった。

3. 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制整備

全国ブロックごとのコア地衛研 6 機関、インフルエンザ研究を長年実施し地域的特徴を有するサポート地衛研 5 機関合計 11 機関からなるコア・サポート地衛研を組織し、感染研との迅速な連携体制を導入した。これによって、コア地衛研により、電子メールを主体とする全国 6 ブロック内地衛研のインフルエンザ担当者への連絡体制が確立された。

4. オセルタミビル耐性サーベイランスの実地検証

感染研で新たに開発した TaqMan RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの地衛研への適用にあたり、11 地衛研は機種別マニュアルの試用に参画し、検体を用いた実地検証を実施して 11 月中にすべてのデータを感染研の検査系開発チームに還元した。その際、培地中に含まれるフェノールレッドの影響についてとくに検討を加え、マニュアル改良に反映させた。

5. オセルタミビル耐性サーベイランスの実施

2009/10 シーズンの A/H1N1pdm 分離株 7, 876 株のうち 78 株が H275Y 耐性マーカーをもっており、検出率は 1.0%であった。また 2010/11 シーズンの A/H1N1pdm 分離株 488 株の 8 株が H275Y 耐性マーカーをもっており、検出率は 1.6%であった。

## 6. 薬剤感受性試験

H275Y 耐性マーカーをもつ分離株は、オセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性を示した。一方、これらは、ザナミビルとラニナミビルに対しては感受性を保持していた。さらに、A/H3N2 分離株 76 株および B 型分離株 113 株について薬剤感受性試験を行った結果、いずれも両薬剤に対して感受性であり耐性株は検出されなかった。

## 7. A/H1N1pdm09 に対する抗体保有調査

高齢者施設の医療従事者と一般病院の従事者の血清 534 件および高齢者施設の入所者の血清 50 件について調査した。医療従事者の新型に対する 40 倍以上の HI 抗体は全体の 23.2%が保持していた。GMT は 11.3 と低かった。年代別の HI 抗体保有率では、20-50 代が 20%台と高かったが、60 代以降では急激に抗体保有率がさがった。ワクチン接種、非接種群にわけて解析したところ、ワクチンを接種した 20-60 代では抗体保有率は 20-30%とほぼ同程度であり、それに対して非接種者では 10-20%と低かった。

## 8. ウイルス NA および M 遺伝子解析による流行株のトレンド把握

A/H1N1pdm および B 型については、2009/2010 シーズンと 2010/2011 シーズンとで際立った違いは見られなかった。A/H3N2 では NA 分節に特定のアミノ酸置換の増加傾向が認められた。いずれの型、分節についても、薬剤耐性変異はこれまでと同様であった。

## 9. 2009 年 A 香港型 (H3N2) および B 型ワクチン株の抗原性変化と HA 遺伝子変化の解析

ワクチン株製造過程で生じる HA 蛋白質の変化を構造レベルで解析した。2009 年の A 香港型と B 型のワクチン原株の HA は、鶏卵での

馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることがわかった。今後のワクチン株選定においては、鶏卵培養や細胞培養によるワクチン原株の抗原性変化のリスクを事前に検討することが極めて重要になることが分かった。一方、サーベイランスにおいても、流行株の抗原性や病原性変化につながる HA の変異の種類を迅速に把握することが必要であった。

## D. 考察

わが国のインフルエンザ株サーベイランス網をこれまで以上に強化し、組織的により機動力を持たせる試みとして、全国 77 地衛研の地方ブロック代表であるコア・サポート地衛研ネットワークが組織された。これにより、感染研で新規に開発した耐性株検出系を地衛研へ技術移転する前に、コア・サポート地衛研で事前に実地検証できる共同研究体制が確立された。これにより、感染研と地衛研の連携が強化されたより効果的な株サーベイランスへの第一歩を踏み出すことができた。また、今後高病原性などハイリスク変異株を早期に捕捉するサーベイランスへと発展させることが期待できる。一方、本研究では、こまでのウイルス遺伝子系統樹解析に加えて、遺伝子変化をより機能的に捉え、その後のウイルスの変化予測へと発展させる技術開発に着手したことから、それを応用することによりワクチン株選定法の改良へ貢献することが期待できる。

## E. 結論

- TaqManPCR によるオセルタミビル耐性マーカーH275Y を持つウイルスの高感度検査系が構築された。
- 全国ブロックごとのコア・サポート地衛研ネットワークが組織され、感染研との連携を強化したサーベイランス体制ができた。
- 薬剤耐性株サーベイランスの結果、オセルタミビル耐性株を散発的に捉え、それはヒト-ヒト間での感染拡大は無いことを確認した。
- A/H1N1pdm09 ウイルスに対する抗体調査の結果、ワクチン接種者でも抗体価は減少しており、2010-2011 年シーズンもワクチン接種が必要であると考えられた。
- 流行株の NA, M 遺伝子の解析結果から、A/H1N1pdm および B 型については、2009/2010 シーズンと 2010/2011 シーズンとで際立った違いは見られなかった。A/H3N2 では NA 分節に特定のアミノ酸置換の増加傾向が認められた。
- ワクチン株製造過程で生じる HA 蛋白質の変化を構造レベルで解析した結果、2009 年の A 香港型と B 型のワクチン原株の HA は、鶏卵での馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることがわかった。今後のワクチン株選定においては、鶏卵培養や細胞培養によるワクチン原株の抗原性変化のリスクを事前に検討することが極めて重要である。

## 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

Osetamivir-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, Tochiyama 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.

TeiichiroShiino NobuhikoOkabe, YoshinoriYasui, TomimasaSunagawa, MakotoUjike, MasatsuguObuchi, NorikoKishida, HongXu, EmiTakashita, AkaneAnraku, ReikoIto, TerukoDoi, MihoEjima, HiromiSugawara, HiroshiHorikawa, ShujiYamazaki, YumikoKato, AkioOguchi, NobuyukiFujita, TakatoOdagiri, MasatoTashiro, HaruoWatanabe. 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, Suzuki 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 *Food Chemistry* 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.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

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）  
地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬  
剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究  
分担研究報告書

インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間  
および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

研究分担者 皆川 洋子 愛知県衛生研究所 所長

研究協力者

池田辰也、水田克己	山形県衛生研究所（コア地衛研）
長島真美、新開敬行、林 志直	東京都健康安全研究センター（コア地衛研）
加瀬哲男、高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所（コア地衛研）
戸田昌一、調 恒明*	山口県環境保健センター（コア地衛研）
吉富秀亮、千々和勝己	福岡県保健環境研究所（コア地衛研）
駒込理佳、長野秀樹	北海道衛生研究所
川上千春	横浜市衛生研究所
小淵正次、滝澤剛則	富山県衛生研究所
内野清子、田中智之	堺市衛生研究所
平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
山下和子	国立感染症研究所 感染症情報センター
安井善宏	愛知県衛生研究所（コア地衛研）

\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長

研究要旨

2009/2010 シーズンに発生した A/H1pdmN1 ウイルスによるパンデミックインフルエンザを契機に、国立感染症研究所（以下：感染研）と地方衛生研究所（以下：地衛研）の緊密な連携に基づく全数検査診断実施とその後到来した第 1 波対応の経験をふまえ、地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会と緊密な連絡調整を行いつつ国内におけるインフルエンザウイルス・サーベイランス体制の維持強化に必要な連携体制づくりに着手した。

とくに抗ウイルス剤感受性変化などのハイリスク変異株サーベイランスの強化に努めている。

(1) 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制整備：

全国ブロックごとのコア地衛研 6 機関、インフルエンザ研究を長年実施し地域の特徴を有するサポート地衛研 5 機関合計 11 機関を主な研究協力者としてメーリングリストを作成し、感染研との迅速な連携体制の導入をはかるとともに、下記の実地検証に着手した。

(2) オセルタミビル耐性サーベイランスの実地検証

研究分担者の高下博士、影山博士らが新たに開発したリアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの実地検証（新たな試験法の試験運用及び従来法との比較を含む検討）を、11 地衛研が担当した。その後の全地衛研での運用をより円滑に行えるよう、ブロックごとにコア地衛研が中心となって他地衛研への普及や現場から開発者へのフィードバックをはかっている。

(3) 耐性サーベイランス実地検証に先立ち、コア地衛研により各ブロック内全地衛研のイ

ンフルエンザ担当者への連絡体制が確立され、リアルタイム PCR 機種情報更新調査が迅速に行われた。

(4) 協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供に努める傍ら、各ブロックの地衛研の意見や要望を拾い上げ、必要に応じて協力地衛研間および感染研担当者間で情報共有している。地衛研現場の声を汲み取る形で、感染研より 2010 年から 2011 年にかけて国内各地で発生している高病原性鳥インフルエンザ検査対応について追加情報が寄せられた。

(5) 2010/2011 シーズン流行早期に A/H1N1pdm ウイルスの耐性株を TaqMan RT-PCR 法により検出し、速報した。1 例はペラミビル単独投与後、1 例はオセルタミビル投与後であり、275H/Y mixture 変異株であったことから、薬剤の選択圧による耐性変異と推察された。

(6) リアルタイム RT-PCR 陽性臨床検体を用いて新型インフルエンザ A/H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出系の事前評価を行った。その結果、臨床検体を用いる場合は本検出系を最適化する必要があることが示唆された。

## A. 研究目的

2009/2010 シーズンに発生した A/H1pdmN1 ウイルスによるパンデミックインフルエンザは、わが国の公衆衛生・医療体制に対する試練となった。国立感染症研究所（以下：感染研）と地方衛生研究所（以下：地衛研）の緊密な連携に基づいて、国内発生前に全自治体をカバーする全数検査診断体制が確立・実施された。その後到来した流行第 1 波に際しては、インフルエンザウイルスサーベイランス・入院サーベイランスと同時に H275Y 変異株検出によるオセルタミビル感受性サーベイランスが実施され、現在もウイルスサーベイランス、重症サーベイランスおよび薬剤感受性サーベイランスとして継続中である。上記の経験をふまえ、当研究班長より地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会に、地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究への参画要請があり、国内におけるインフルエンザウイルス・サーベイランス体制の維持強化に必要な連携体制づくりが開始された。

平成 22 年度の具体的な研究目的は、地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症部会と連携し、

1) 各地方ブロックのコア地衛研を基軸とした連携網の構築と強化を行い、ハイリスク変異株を迅速に捉える全国的株サーベイランスの実施。

2) とくに抗ウイルス剤感受性変化を念頭に、ハイリスク変異株を確実に捉える検査系の構築と改訂を進め、その流行拡大時には、速やかに全国一斉に検査が開始できる体制構築。の 2 点に集約可能である。

このほか次年度以降に実施が期待される目的には、

- ・ハイリスク変異株等 emerging mutant に対する強化サーベイランスについて全地衛研に研修の機会を提供する。
  - ・H5, H7, H9, H2 を含む網羅的なインフルエンザウイルス検出及び型別に関する地衛研の精度管理体制の構築。
  - ・国内外からの報告に基づいた新たな変異検出システムの構築。
- 等があげられる。

## B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症部会と連携し、

1) レファレンスセンター（コア地衛研）6 機

関に加え、助言者（サポート地衛研）5 機関計 11 機関が研究協力者として参画し、感染研とともに、ハイリスク変異の出現や現行検査系の精度について情報収集及び相互情報交換を密に行い、国内における mutant 検出感度を高める。

- 2) 研究協力地衛研はハイリスク変異株等 emerging mutant に対する強化サーベイランスを先行的に実施する。22 年度は薬剤耐性株 H275Y サーベイランス継続を主とする。
- 3) 上記 2) H275Y 検出手法である現行のシーケンシスはシーケンサー未配備の地衛研では実施できないので、高下、影山博士らが新たに開発したリアルタイム PCR 試験法の導入により地衛研のワークロードの軽減ができないか検討する。
- 4) 上記 2) の試験法について、高下博士らの準備したマニュアルを研究協力地衛研において検討するとともに、各地衛研において試験運用し、標準化に必要なデータを提供する。
- 5) 上記 2) の試験法について、コア地衛研（6 か所）は地区でサーベイランスを実施している全地衛研に情報提供するとともに、可能であれば研修の機会を提供する。
- 6) 全地衛研で実施する試験法選択にあたっては、全国の PCR 機器配備状況（プログラムインストール状況を含む）を把握する必要があるため、前地全協感染症対策部会長で研究協力者の田中所長より、21 年度に全国調査を行ったデータを提供いただき、22 年度の情報更新調査を行う。
- 7) 6) の情報更新調査に際して、各コア地衛研により各ブロック内全地衛研のインフルエンザ担当者への連絡体制が確立する。
- 8) リアルタイム PCR 試験法の試験運用にあたり、一部の機関において詳細な検討を実施。
  - ・分離株を検体とする場合 RNA 抽出作業の省略が可能か、検証する。
  - ・分離株に加えて、臨床検体からの直接検出を試みる。

- 9) インフルエンザに関する種々の病原体サーベイランスを積極的に実施するとともに、インフルエンザウイルス関連情報の迅速な提供に努める。

（倫理面への配慮）

本研究で用いる臨床検体及び患者情報は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施する。症例の分析においては、個々の症例が特定できないよう配慮して行う。

## C. 研究結果

- 1) 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制整備：

全国ブロックごとのコア地衛研 6 機関、インフルエンザ研究を長年実施し地域的特徴を有するサポート地衛研 5 機関合計 11 機関を主な研究協力者としてメーリングリストを作成し、感染研との迅速な連携体制を導入した。

コア地衛研により、電子メールを主体とする全国 6 ブロック内地衛研のインフルエンザ担当者への連絡体制が確立された。

- 2) 上記連絡体制を活用して、コア地衛研により各ブロック内全地衛研のリアルタイム PCR 機種情報更新調査が迅速に行われた。
- 3) オセルタミビル耐性サーベイランスの現地検証：

研究分担者の高下博士、影山博士らが新たに開発したリアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの地衛研への適用にあたり、11 地衛研は機種別マニュアルの試用から関わり、検体を用いた現地検証（新たな試験法の試験運用及び従来法との比較を含む検討）を実施して 11 月中にすべてのデータを高下博士に提供した。その際培地中に含まれるフェノールレッドの影響についてとくに検討を加え、マニュアル改良に反映させることができた。

- 4) 横浜市衛生研究所においては、2010/2011 シーズン流行早期に A/H1N1pdm ウイルスの耐性株を TaqMan RT-PCR 法により検出し、速報した。1 例はペラミビル単独投与後、1 例はオセルタミビル投与後であり、275H/Y mixture 変異株であったことから、薬剤の選択圧による耐性変異と推察された。
- 5) 富山県衛生研究所においては、新型インフルエンザ A/H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出系の事前評価を、分離株に加えてリアルタイム RT-PCR 陽性臨床検体を用いて行った。その結果、臨床検体を用いる場合は本検出系を最適化する必要があることが示唆された。
- 6) 平成 22 年 11 月以降、全国各地より野鳥および家禽の高病原性鳥インフルエンザ(H5N1) 発生報告がある。地衛研は主に衛生部局の試験検査機関として、家禽殺処分等にあたる防疫作業従事者等ヒト検体のインフルエンザウイルス検査を担当することとなる。分担研究者らは感染研との連携に努めた結果、現在鳥の間で流行している H5N1 ウイルスに関する追加情報が発出され全地衛研で共有された。

#### D. 考察

- 1) 協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供に努める傍ら、各ブロックの地衛研の意見や要望を拾い上げ、必要に応じて協力地衛研間および感染研担当者間で情報共有している。2009 年以降インフルエンザウイルス検査法として PCR 法が一般的に認識され、検体採取後 6 時間以内の結果還元が当然と期待されている。このためウイルス分離と赤血球凝集価による型別によるサーベイランス主体であった数年前と異なり、顔の見える者の間でのみ可能となる高度な情報共有なしには、しばしば対応困難な場面に遭遇する。
- 2) 高下博士らによる新しい耐性サーベイランス試験法の検証に結果を出すことができ、感染研と協力地衛研間の連携は顕著に強化

されたと思われる。今後はブロック内の連携強化にとりくみたい。

- 3) 検査マニュアル、追加情報等の共有にあたっては、感染研インフルエンザウイルス研究センター、感染症情報センター病原微生物検出情報 (IASR) 事務局と地衛研担当者とのネットワーク活用が必要不可欠である。
- 4) 2010 年から 2011 年にかけて高病原性鳥インフルエンザが国内各地で発生しており、地衛研においても H5, H7 等の検査法検証及び検査体制強化を図る必要性が高まった。

#### E. 結論

パンデミックインフルエンザを契機に感染研と地衛研の緊密な連携に基づく全数検査診断実施経験をふまえ、地方衛生研究所全国協議会感染症対策部会と緊密な連絡調整を行いつつ全国ブロックごとのコア地衛研 6 機関、サポート地衛研 5 機関合計 11 機関とともにインフルエンザウイルス・サーベイランス検査研究体制整備をはかり、まずメーリングリストを主体とした感染研との迅速な連携体制を導入した。リアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの実地検証 (マニュアル試用、新たな試験法の試験運用、及び従来法との比較を含む検討) を担当した。一部機関においては、臨床検体への応用はじめ、実用的で有用な検討が先行的に実施された。

耐性サーベイランス実地検証に先立ち、コア地衛研により各ブロック内全地衛研のインフルエンザ担当者への連絡体制が確立され、リアルタイム PCR 機種調査が迅速に行われた。

協力地衛研は、インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供に努めており、地衛研現場の声を汲み取る形で、感染研より 2010 年から 2011 年にかけて国内各地で発生している高病原性鳥インフルエンザ検査対応に関する追加情報が発せられた。今後はハイリスク要因として、薬剤耐性、抗原性変異とともに、鳥インフルエンザ検査対応も検討したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic individuals - Pandemic H1N1 influenza reveals “occult” asthma. *Pediatric Allergy and Immunology*, in press
- 2) Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe K, Fukano, R., Ichiyama, T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*, in press
- 3) 駒込理佳、井上真紀、長野秀樹、工藤伸一、岡野素彦. 北海道におけるパンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザについて - 2009/10 シーズン - 北海道立衛生研究所報 60 : 57-60, 2010.
- 4) 喜屋武向子、平良勝也ほか 13 名. 2009/10 シーズン夏季のインフルエンザ検出状況 - 沖縄県. 病原微生物検出情報 31(10):297, 2010.
- 5) 川上千春 百木智子 七種美和子 宇宿秀三 野口有三 池淵 守. <速報> B型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) の局地的流行 - 横浜市. 病原微生物検出情報 32(2):47, 2011.
- 6) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、藤浦明、皆川洋子. 小学校集団発生から分離された B 型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) - 愛知県. 病原微生物検出情報 31(6):173, 2010.

### 2. 学会発表

- 1) Kawakami C et al. Detection and isolation of Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus from

stool sample. Options for the Control of Influenza VII 香港 2010年9月

- 2) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘. 胃腸炎症状をともなう AH1pdm インフルエンザウイルスの検索. 第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会 仙台 2010年11月
- 3) 川上千春、宇宿秀三、七種美和子、熊崎真琴、N Sriwilaijaroen、鈴木康夫 同一患者の咽頭および糞便検体から分離された AH1pdm インフルエンザウイルスの解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- 4) 中内美名、高下恵美ほか、全国地方衛生研究所 AH1pdm 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 徳島 2010年11月
- 5) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、藤浦明、皆川洋子 愛知県で分離した新型インフルエンザウイルス AH1pdm の分子疫学的解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- 6) 藤原範子、安井善宏、秦真美、(ほか6名)、皆川洋子 新型インフルエンザ(AH1pdm) 第一波のウイルス性状解析 平成 22 年度愛知県公衆衛生研究会 愛知県大府市 2011年1月

### 3. シンポジウム、講演等

- 1) 平良勝也ほか 沖縄県における新型インフルエンザ流行状況について シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿児島市 平成 22 年 5 月 25 日~26 日
- 2) 川上千春ほか 横浜で分離した新型インフルエンザウイルス AH1pdm の分子疫学解析 シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿児島市 平成 22 年 5 月 25 日~26 日
- 3) 高橋和郎、加瀬哲男ほか 新型インフルエンザにおける不顕性感染の発生頻度に関する研究 シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿

児島市 平成 22 年 5 月 25 日～26 日

**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



## リアルタイム PCR 法を用いた H275Y オセルタミビル耐性株の検出系の構築について

研究分担者 影山努 国立感染研究所・インフルエンザウイルス研症究センター第二室 室長  
研究協力者 中内美名 国立感染研究所・同第二室 研究員  
高山郁代 国立感染研究所・同第二室 研究員

**研究要旨** 2009年4月以降、ブタインフルエンザウイルスに由来した A/H1N1 インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)が世界規模で大流行(パンデミック)し、A/H1N1pdm の流行が広がるにつれ、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸に特徴的な変異(H275Y)を持つオセルタミビル耐性株が散発的に検出されるようになった。

本研究ではNA遺伝子の部分シーケンス法よりも簡便で迅速なリアルタイム PCR 法を用いた H275Y 変異検出法の開発を行った。その結果、A/H1N1pdm オセルタミビル耐性株の国内発生状況を迅速に把握する事が可能となり、我が国の薬剤耐性株サーベイランス事業に大きく貢献した。

### A. 研究目的

2009年4月以降、ブタインフルエンザウイルス由来の A/H1N1 インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)が世界規模の大流行(パンデミック)を引き起こした。A/H1N1pdm は出現当初よりアマンタジン、リマンタジンなどの M2 ブロッカーに耐性であったため、オセルタミビル、ザナミビルなどのノイラミニダーゼインヒビター(NAI)が治療薬として推奨された。しかし流行が広がるにつれ、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸に特徴的な変異(H275Y)を持つオセルタミビル耐性株が散発的に検出されるようになった。日本は世界最大のオセルタミビル使用国であり、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関での治療方針の

見直しが必要となる。そのため耐性株の迅速な発生状況の把握が、公衆衛生上極めて重要である。本研究では、NA 遺伝子の部分シーケンス法よりも、簡便で迅速なリアルタイム PCR 法を用いた H275Y 変異の検出法の構築を目的として本研究を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 検査系の構築

A/H1N1pdm の NA 遺伝子配列をもとに、823 番目の核酸が C(H275)であるオセルタミビル感受性株を検出する蛍光プローブ(VIC 標識)と T(Y275)である耐性株を検出する蛍光プローブ(FAM 標識)をそれぞれ設計した。これらのプローブ領域を挟むようにプライマーを設計した。これらを用いて、

H275 を持つ株と Y275 を持つ株を識別する duplex one-step RT-PCR 系を構築した。

## 2. 最適な試薬の選択と反応条件の最適化

検査系の検証には、ブラック精製をして得られた A/Denmark/524/2009 (H275)、A/Denmark/527/2009 (Y275) 株、A/Chiba/1016/2009 (H275) 株、A/Chiba/1017/2009 (Y275)株より精製した陽性コントロール RNA、各自治体の地方衛生研究所および感染研で分離及び NA 遺伝子シーケンスした 2009/10 シーズンの A/H1N1pdm 臨床分離株および季節性ヒトインフルエンザ臨床分離株を用いた。臨床分離株については、より操作を簡便化することを目的に、RNA 抽出を行わずに感染細胞の培養上清を直接リアルタイム RT-PCR に用いた。各社から市販されているリアルタイム RT-PCR キットを用いて、比較検討を行うとともに、なるべく短時間で反応が終わるように反応条件の最適化を行った。

## 3. 様々な機器への最適化

本研究の検証には Roche Lightcycler 480II と解析ソフト SW1.5 を用いたが、全国地方衛生研究所での実施にあたり、他の検出機器でも本法の有用性の検討と最適化を行った。

## C. 研究結果

### 1. 検査系の特異性・検出感度の検証

初めに、陽性コントロール RNA を用いて、様々な組み合わせのプライマー&プローブを検討した。結果、表 1 に示した組み合わせが最も良く耐性株と感受性株を識別でき、高感度に検出することが可能であった (図 1)。

さらに RNA 抽出を行わずに、感染細胞の培養上清を直接リアルタイム RT-PCR 反応液に加える事で、検査系をより簡便化できるかどうかの検討を行った。細胞培養液中には様々な RT-PCR 反応を阻害する物質が含まれており、それらの影響を受けずに検査系がきちんと機能するように、反応試薬および反応条件の最適化を検討する必要があった。各社から市販されている様々な試薬を検討したところ、キアゲン社の QuantiTect Virus + ROX Vial kit が最適であった。また、本試薬を用いることにより、2 時間以内で解析結果を得ることが可能であった。また、細胞培養試薬組成によっては RT-PCR 反応が阻害される場合があったが、滅菌蒸留水で 10 倍希釈を行う事で、RT-PCR の反応阻害が解消された。

このように構築した検出系では、A/H1N1pdm 臨床分離株および季節性ヒトインフルエンザ臨床分離株を用いて検討した結果、全ての臨床分離株は H275、Y275、または両者の mix に識別され (図 2)、その結果はシーケンスの結果と一致した。また、他の亜型の分離株との交差反応性は認められず、A/H1N1pdm 亜型特異的な H275Y 変異の検出が可能であった。

### 2. 様々な機器への最適化

本研究の検証には Roche Lightcycler 480II を用いて検討を行ったが、全国地方衛生研究所での実施にあたり、他の検出機器での本検出法の有用性の検討と最適化が必要となった。全国地方衛生研究所での使用予定機器に関して調査した結果、Roche Lightcycler 480II 以外で、ABI 社では 5 機種、3 種類の解析ソフト、また Agilent 社では 1 機種、1 種類の解析ソフトが使用予定

であった。そのため、各機器をメーカーより借り受け、それぞれの機器を用いて試薬と反応条件の最適化を行った。その結果、反応条件などをわずかに変更するだけで、全ての使用予定機器での本検出法の実施が可能である事が明らかとなった。

#### D. 考案

A/H1N1pdm 亜型インフルエンザウイルス薬剤耐性株のサーベイランスは、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸変異(H275Y)の検出を 1 次スクリーニングとして行い、並行して臨床分離株の薬剤に対する感受性試験を行う、という方法でこれまで実施されてきた。H275Y 変異の検出は、臨床分離株の NA 遺伝子を部分シーケンスする事で行われてきた。しかし、シーケンス法はウイルス分離を行った後に、RNA の精製、RT-PCR 反応、PCR 反応産物の精製、シーケンス反応、シーケンス反応後のダイナーミネータ除去、シーケンサー解析など、非常に多くのステップを必要とし操作方法も非常に煩雑である。そのため、大量の検体をスクリーニングする方法としては不向きであり、検体間でクロスコンタミネーションのリスクが増大する可能性もあった。一方、今回構築したリアルタイム RT-PCR 法を用いた H275Y 変異の検出法は、感染細胞の培養上清(RT-PCR 反応阻害が起きる場合は、滅菌蒸留水で 10 倍希釈した培養上清を用いる)とリアルタイム RT-PCR 反応液を混合し、リアルタイム PCR 機器で反応するだけの非常に簡便な方法である。RNA 精製など煩雑な検体処理のステップも不要で、検体間のクロスコンタミネーションリスクが軽減される事から、

部分シーケンス法と比較してより効率的にたくさんの臨床分離株の H275Y 変異スクリーニングが可能である。

また、本検出系はこれまで我々が開発した A 型インフルエンザウイルス検出リアルタイム RT-PCR 法と同程度の感度 (7.5 copies/reaction) を持つため、精製した検体やウイルス RNA を用いれば、高感度な A/H1N1pdm 亜型特異的 H275Y 変異株の検出が可能である。

各社から様々なリアルタイム PCR 用の機器が販売されているが、蛍光色素の励起・検出システムやサーマルサイクラーの性能など、その特徴や仕様は多岐にわたっているため、全く同じ試薬組成や反応条件でも、解析結果にばらつきがでる事があるため、機器ごとに条件の最適化を行う必要がある

今回、Roche Lightcycler 480II 以外の 6 機種においても検討を行い、条件の最適化を行った事で、全国地方衛生研究所でも本検出系の実施が可能となった。

#### E. 結論

今回、新たに構築した本検出法により、より簡便で迅速に A/H1N1pdm 亜型インフルエンザウイルスの H275Y 変異株を検出することが可能となった。オセルタミビル耐性株発生状況を迅速に把握する必要がある全国規模の薬剤耐性株サーベイランス事業に大きく寄与したと考えられる。

#### F. 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

G. 研究発表

1. 論文発表

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*, 16(6):926-935, 2010

Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa, Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihira, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, 83(1):10-15, 2011

Mina Nakauchi, Yoshihiro Yasui, Tatsuya Miyoshi, Hiroko Minagawa, Tomoyuki Tanaka, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama.: One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *Journal of Virological Methods*.

2. 学会発表

・国際会議

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

Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa, Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihira, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus.

Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010, September

・国内会議

森安義、仙波晶平、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山努、中内美名：遺伝子迅速診断としての LAMP 法。第 51 回日本臨床ウイルス学会、2010 年 6 月

仙波晶平、森安義、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山努、中内美名：LAMP 法を用いたインフルエンザウイルスの簡易迅速遺伝子検査法。第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月