

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

影山努、中内美名、田代眞人、吉川哲史、  
中井英剛、菅田健、吉川明子、浅野喜造、  
井平勝: Direct RT-LAMP 法を用いたインフ  
ルエンザウイルス A/H1N1pdm 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

表 1. プライマーおよびプローブの配列

Names	Sequences (5'-3')	Orientation	Position <sup>a</sup>
Primers			
H1N1NA-F690-719	ATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTAC	+	690-719
H1N1NA-R847-872	ACACATGTGATTTCACTAGAATCAGG	-	847-872
Probes			
FAM-274Ya-swH1N1-F823-835 (for detecting resistant virus)	(FAM)TACTATGAGGAAT(MGB)	+	823-835
VIC-H274a-swH1N1-F823-835 (for detecting susceptible virus)	(VIC)CACTATGAGGAAT(MGB)	+	823-835

<sup>a</sup>The nucleotide positions of NA genes are based on cRNA sequences obtained from GISAID database. Isolate ID numbers for NA genes of A/Denmark/524/2009 and A/Denmark/528/2009 are EPI\_ISL\_33836 and EPI\_ISL\_33837.

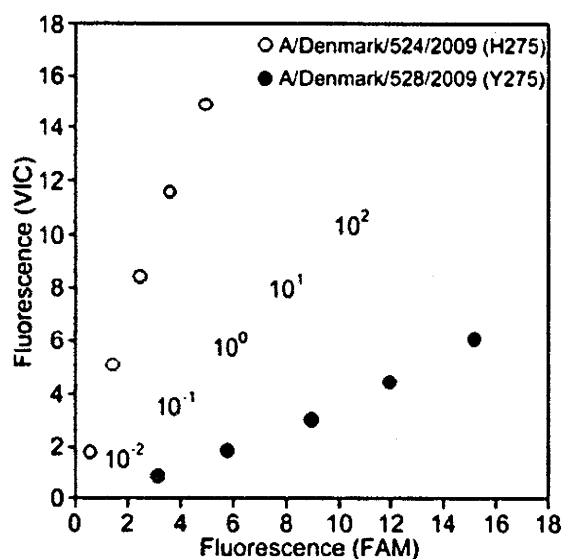
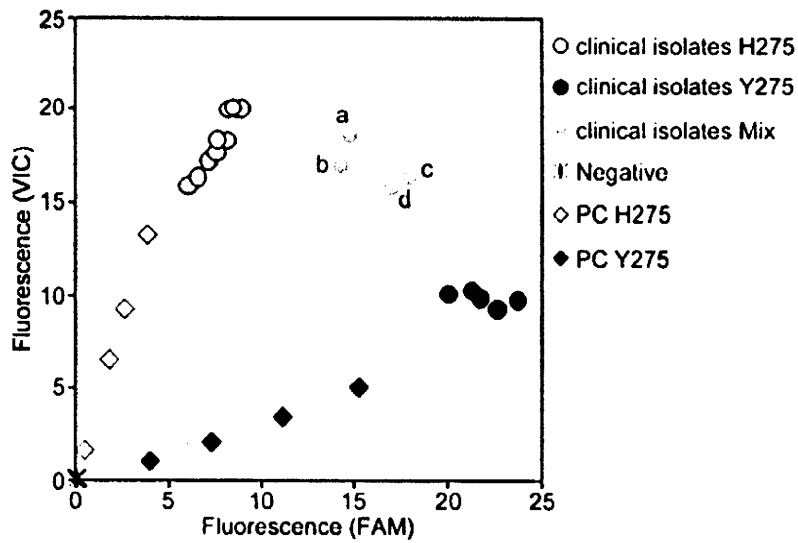


図1. Endpoint fluorescence plot. Serial dilutions of A/Denmark/524/2009 (open circle) and A/Denmark/528/2009 (filled circle) were analyzed by H275Y RT-PCR assay. Viral titers of these two isolates were  $3.16 \times 10^2$ ,  $3.16 \times 10^1$ ,  $3.16 \times 10^0$ ,  $3.16 \times 10^{-1}$ , and  $3.16 \times 10^{-2}$  TCID50/reaction and are represented in the center line of the plot as  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$ , and  $10^{-2}$ , respectively. The plot was generated using the average of the results obtained from the assay performed in six replicates. Relative H275 (VIC) and Y275 (FAM) fluorescence are plotted on the y-axis and x-axis, respectively.



[x]2. Endpoint fluorescence plot of H275Y RT-PCR assay using clinical isolates. Relative H275 (VIC) and Y275 (FAM) fluorescence are plotted on the y-axis and x-axis, respectively. Clinical isolates discriminated as H275, Y275, or mix are represented as open circles, filled circles, or gray circles, respectively. Viral titers of  $3.16 \times 10^1$ ,  $3.16 \times 10^0$ ,  $3.16 \times 10^{-1}$ , and  $3.16 \times 10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/ reaction of A/Denmark/524/2009 (PC H275, open diamond) and A/Denmark/528/2009 (PC Y275, filled diamond) were used as positive controls for the assay.

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

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

研究分担者 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

### 研究要旨

2009年4月中旬からメキシコ、米国で出現したパンデミック (H1N1)2009 (A/H1N1pdm) ウイルスはその後世界中に広がった。世界各国で分離されているA/H1N1pdmウイルスのほとんどはオセルタミビルおよびザナミビルに対して感受性であるが、散発的にNA蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。そこで我々は全国地方衛生研究所との共同研究により、2009年9月からA/H1N1pdm薬剤耐性株サーベイランスを実施している。2009/10シーズンおよび2010/11シーズンにおけるオセルタミビル耐性A/H1N1pdm株の検出率は約1-2%であった。オセルタミビル耐性株の大半はオセルタミビルの治療または予防投与例から検出された散発例であり、現在のところ、ヒトからヒトへの感染伝播が拡大する傾向もないが、引き続き薬剤耐性株の発生状況の監視を続ける必要がある。

#### A. 研究目的

2009年にメキシコ、米国で出現したA/H1N1pdmウイルスはその後、日本を含む世界各国に広がった。A/H1N1pdmの予防および治療には、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 蛋白を標的とする抗インフルエンザ薬、オセルタミビル (商品名タミフル) とザナミビル (商品名リレンザ) が使用されている。世界各国で分離されているA/H1N1pdm株のほとんどは両薬剤に対して感受性であるが、散発的に、NAに特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要とな

る。したがって、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極めて重要である。そこで我々は全国地方衛生研究所との共同研究により、2009年9月からA/H1N1pdm薬剤耐性株サーベイランスを実施している。

#### B. 研究方法

2009/10シーズンのA/H1N1pdm分離株については、各地方衛生研究所において毎週概ね5株を目標値としてNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、H275Yオセルタミビル耐性マーカーの有無を検索した。2010/11シーズンからは、毎週概ね3株を目標値として新規に構築したTaqMan

RT-PCR法によりH275Yオセルタミビル耐性マーカーの有無を検索した。H275Y耐性マーカーをもつ分離株については、引き続き国立感染症研究所において遺伝子解析およびNA-Star基質を用いた化学発光法による抗インフルエンザ薬剤感受性試験を実施した。抗インフルエンザ薬剤感受性試験は、2009/10シーズンには、オセルタミビル、ザナミビルおよび2010年1月に国内販売が開始された新規承認薬剤ペラミビル（商品名ラピアクタ）の3種について実施し、2010/11シーズンには2010年10月に国内販売が開始された新規承認薬剤ラニナミビル（商品名イナビル）を加えた4種について実施した。

#### C. 研究結果

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。H275Y耐性マーカーをもつ分離株について薬剤感受性試験を行った結果、すべての株はオセルタミビルに対して耐性であることが確認された。また、すべてのオセルタミビル耐性株はペラミビルに対して交叉耐性を示した。一方、すべてのオセルタミビルおよびペラミビル耐性株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。また、全国地方衛生研究所から国立感染症研究所に分与された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。

#### D. 考察

2008/09シーズンにはオセルタミビル耐性の季節性A/H1N1株が世界中に広がり、わが国でもオセルタミビル耐性A/H1N1株の検出率は99.7%に達した。2009/10シーズンおよび2010/11シーズンに国内で検出されたオセルタミビル耐性A/H1N1pdm株の検出率は約1-2%であり、この検出率はオセルタミビル耐性の季節性H1N1株が国内に侵入する以前の時期における国内での耐性季節性H1N1株の検出率とほぼ同様であった。

#### E. 結論

2009/10シーズンおよび2010/11シーズンに国内で検出されたオセルタミビル耐性A/H1N1pdm株の大半はオセルタミビルの治療または予防投与例から検出された散発例であり、現在のところ、ヒトからヒトへの感染伝播が拡大する傾向もないが、引き続き薬剤耐性株の発生状況の監視を続ける必要がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H. Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of

human metapneumovirus. *BMC Infect. Dis.* 10:170, 2010.

Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike M, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H. 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:e11057, 2010.

Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y. Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults. *J. Med. Virol.* 82:2092-2096, 2010.

Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S. Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J. Virol.* 85:1322-1329, 2011.

## 2. 学会発表

Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E. Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, June 2010  
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

Nakauchi M, Kageyama T, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Odagiri T, Tashiro M, Oba K, Konomi N, 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*, 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, Suzuki 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

Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S. The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication. *Options for the Control of Influenza VII*, September 2010

Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K. Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. *Options*

for the Control of Influenza VII, September 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。

該当なし

## 2. 実用新案登録

該当なし

## 3. その他

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

## 「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」

研究分担者 齋藤 玲子 新潟大学大学院医歯学系・講師

研究協力者 鈴木康司 1)、鈴木宏 2)

1) 新潟大学大学院医歯学系、2) 新潟青陵大学

### 研究要旨

新型インフルエンザ第二波直前の 2010 年 8-9 月時点の一般病院と高齢者施設の医療従事者、高齢者施設の入所者における H1N1pdm に対する HA 抗体価血清疫学調査を行った。

医療従事者 534 名（年齢 20-79 才）と、高齢入所者 50 名（63-100 才）のワクチン接種前 HA 抗体価の測定を行った。医療従事者は 40 倍以上の抗体価を 23.2%が保持しており、GMT は 11.3 であった。入所者は 4%が 40 倍以上の抗体価を保持しており、GMT は 5.6 であった。2009 年に新型ワクチンを接種者した医療従事者の抗体価は、非接種者より有意に高かった。

年齢別の 40 倍以上の抗体価保有率は 20-60 代は 20%台であったが、それ以降の年代は 0-10%と低かった。70 代以降ではワクチン接種者がわずかであったため、抗体価保有率が低くなったと考えられる。20-60 代のワクチン非接種群の抗体価保有率は 10%程度で、その年代での新型インフルエンザ罹患率を反映していると考えられた。90 代では 2 名ワクチン非接種者に 40 倍の抗体価保持者がおり、過去の感染からの Cross reaction と考えられた。

前年度接種者においても抗体価は低かったため、インフルエンザワクチンの接種によるブースターを必要とすると考えられた。

### A. 研究目的

2009 年、メキシコに端を発した新型インフルエンザ H1N1pdm が世界的に大流行を起こし、日本においても、夏以降本格的な地域流行が始まった。2009 年は、新型インフルエンザワクチン（単身）の接種が医療従事者を中心に優先接種なされ、ほぼ同時期に季節性インフルエンザワクチン（季節性

A/H1N1, A/H3N2, B) の接種が行われた。新型インフルエンザワクチンの 40 倍以上抗体価獲得率は一般的に 7 割以上で良好であったとされる。

本研究では、第二波（2010-2011 年）直前の新型インフルエンザに対する HI 抗体価調査を医療従事者と高齢者に対して行い、ワクチン接種の必要性について検討した。



## B. 研究方法

新潟県内の高齢者施設の医療従事者と入所者、一般病院の従事者（医療、事務、清掃者、給食等を含む）でインフォームドコンセントが得られたものに対して 2010 年 8-9 月に血清採血を行い、同時に年齢、前シーズンの新型ワクチン接種歴、季節性ワクチン接種歴、本人の新型インフルエンザ罹患歴、周囲に患者の有無について聴取した。なお、2010-2011 年シーズンワクチンの接種を行う前に採血した。

血清は検査まで $-20^{\circ}\text{C}$ にて新潟大学にて保管し、モルモット赤血球と、デンカ生研社製の新型インフルエンザ A/H1N1pdm 抗原を用いて、定法にのっとり赤血球凝集抑制試験（HI）法にて抗体価の測定を行った。

### （倫理面への配慮）

患者には各医療機関で十分な説明を行い書式にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

## C. 研究結果

高齢者施設の医療従事者と一般病院の従事者（以下医療従事者と略す）の血清は 534 件、高齢者施設の入所者の血清は 50 件採取された。医療従事者の平均年齢は 42.2 才、入所者の平均年齢は 88.7 才であった（表 1）。医療従事者は 20 才以上 79 才、入所者は 63 才から 100 才であった。前年度（2009 年）のワクチン接種歴では、季節性と新型両方打った医療従事者は 65.9%、新型のみ 4.1%、季節性のみ 22.5%であった。入所者には新型接種者はいなかったため、季節性ワクチンのみ 46%が接種していた。

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（表 2）。昨年度の新型ワ

クチンの接種有無で二群に分けて検討したところ、昨年度接種者での HI 抗体価保有者は 28.9%であったのに対し、非接種者では 7.1%と統計的有意差をもって前年度ワクチン接種者の抗体価保有率が高かった（ $p < 0.01$ ,  $\chi^2$  乗統計）。一方、入所者では新型ワクチン非接種者での抗体価保持者は 2 人のみ（4.0%）と低かった。

しかしながら、新型インフルエンザに罹患したと答えた医療従事者は 17 名（3.2%）であり、ごく少数であった。感染源としては家族罹患 6 名、職場の同僚 6 名、5 名は不明であった。新型に感染した者のうち、新型ワクチン接種者は 8 名（20-50 代）で、非接種者は 9 名であった。自覚的な感染者でワクチン接種者の抗体価は 40 倍以上保持者は 3 名（17.6%）と高くはなかった（ $>10$  倍未満 $\sim 80$  倍）。ワクチン非接種者で感染者の HI 抗体も 40 倍以上保持者は 5 名（29.4%）と、同様に高くはなかった。

年代別の HI 抗体価保有率では、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（表 3）。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 代では抗体価保有率は 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。70 代以降は新型ワクチン接種者はごく少数でほとんど非接種者であり、90 代の非接種者に二人のみ 40 倍の抗体価をもった高齢者がいた。

不顕性感染として、非接種者で感染の自覚がない 150 名の医療従事者のうち、11 名（7.3%）が 40 倍以上の抗体価を持っていた。40 倍 7 名、80 倍 3 名、160 倍 1 名であった。

## D. 考察

今回血清調査を行ったのは昨年度優先接種の対象となった医療従事者であったため、新型インフルエンザの接種率は 70%近くと

高めであった。国内外の報告から、新型ワクチンは、1回接種でも抗体価上昇が良好で、40%以上の抗体価を60-70%以上が獲得したと言われる。今回は接種1年後の調査であり、ワクチンを接種した者でも抗体価保有率は20%前後であり、抗体価が明らかに低くなっていた。このため、2010-2011年シーズンにむけてのワクチン接種が必要であると考えられた。

一方で、ワクチン非接種群の抗体価保有率は10%程度で昨年度の罹患状況を反映していると考えられた。一般的に新型インフルエンザは20才以下での罹患率が高く、小学生や中学生では40-50%が罹患したとも言われているが、成人層では10-20%の罹患であったとする報告が多い。今回の調査では成人～高齢者層が調査対象であったため、年齢的と職業上の暴露を考えれば今回の抗体価保有率は妥当な数字と考えられる。

しかしながら、ワクチン非接種で抗体価を保有している成人～壮年層での感染自覚者は9名(56%)と約半数にとどまっており、残りの約半数は不顕性感染であったと考えられる。

90才代の高齢者2名に40倍の抗体価保持者がおり、過去のスペイン風邪罹患によるCross reactionであると推測された。ただ、今回の調査では70才以上の高齢者のうちCross reactionがみられたのはその2名のみであったため、文献より頻度が低く、NT抗体価など、別の検査法の併用も必要であると考えられた。

#### E. 結論と提言

新型インフルエンザの第一波が終わり、二シーズン目の到来に合わせ、新型インフルエンザワクチン接種の必要性について血清疫学の観点から解析した。接種者でもワクチン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。

謝辞：調査にご協力いただいた女池南風苑と新潟県立小出病院に感謝いたします。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

表 1. Demographic details of participants

		Healthcare workers in hospital and nursing home	Residents in elderly nursing home
<b>Number</b>		534	50
<b>Age</b>	<b>Average</b>	42.2	86.7
	<b>Min-max</b>	20-79	63-100
<b>Vaccination in 2009</b>	<b>Seasonal and H1N1 pdm</b>	352	0
	<b>(%)</b>	65.9	0
	<b>H1N1 pdm only</b>	22	0
	<b>(%)</b>	4.1	0
	<b>Seasonal only</b>	120	23
<b>(%)</b>	22.5	46	

表 2. HI antibody against influenza virus H1N1 pdm as of August-September 2010

		Healthcareworkers in hospital and nursing home	Residents in elderly nursing home
All subjects	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	124 (23.2%)	2 (4.0%)
	Geometric mean titer	11.3 (n=534)	5.6 (n=50)
Vaccinees in 2009	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	108(28.9%)	n/a
	Geometric mean titer	13.8 (n=374)	n/a (n=0)
Non-vaccinees in 2009	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	16(10.0%)	2 (4.0%)
	Geometric mean titer	7.1 (n=160)	5.6 (n=50)

表 3. Proportion of subject with HI titer >40 for H1N1 pdm by age group and vaccination history in the previous season

Age group	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100	100+
All subjects	23	36	26	37	2	0	0	2	0
	Proportion (%) with HI titer $\geq$ 40, N								
	21.9	27.7	21.8	25.7	6.1	0.0	0.0	10.5	0.0
	%								
	(n=105)	(n=130)	(n=119)	(n=144)	(n=33)	(n=12)	(n=21)	(n=19)	(n=1)
Vaccinees in 2009	20	30	24	32	2	0	0	0	0
	Proportion (%) with HI titer $\geq$ 40								
	27.4	32.3	26.1	30.5	22.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	%								
	(n=73)	(n=93)	(n=92)	(n=105)	(n=9)	(n=2)	(n=0)	(n=0)	(n=0)
Non-vaccinees in 2009	3	6	2	5	0	0	0	2	0
	Proportion (%) with HI titer $\geq$ 40								
	9.4	16.2	7.4	12.8	0.0	0.0	0.0	10.5	0.0
	%								
	(n=32)	(n=37)	(n=27)	(n=39)	(n=24)	(n=10)	(n=21)	(n=19)	(n=1)

## 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析

研究分担者 藤田信之 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・次長

### 研究要旨

2009/2010 シーズン後半および 2010/2011 シーズン前半の分離株を合わせた約 300 株について、NA 分節および M 分節の塩基配列を決定し、分子系統解析を行なった。A/H1N1pdm および B 型については、両シーズン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。A/H3N2 で見られた増殖不全の原因を探るため、A/H3N2 の全ゲノム解析に着手した。

### A. 研究目的

シーズンを通して新型、季節性インフルエンザウイルスの重要遺伝子分節の全塩基配列を決定し、分子系統解析を行うことにより、薬剤耐性株、ハイリスク変異株等の早期発見に結びつける。重要な変異株が認められた場合には、8 文節の全ゲノム解析を実施し、病原性等に関係する遺伝学的因子とその由来等の解析を行う。

### B. 研究方法

地研等を通して国立感染症研究所に集積された国内外の新型、季節性インフルエンザウイルスの 5-10%を目途に、重要な遺伝子分節の全塩基配列を決定する。今年度は感染研インフルエンザセンターから提供を受けたウイルス RNA を材料として、NA (A 型および B 型) と M (A 型のみ) 分節の塩基配列決定を実施した (別途、感染研インフ

ルエンザセンターにおいて HA 分節の塩基配列決定を行っている)。塩基配列の決定は、(1) 全分節共通のプライマーによる逆転写、(2) 分節ごとのプライマーによる PCR 増幅、(3) 10-16 個のプライマーによるシーケンス、(4) Phred/Phrap によるアSEMBル、の順序で行った。用いたプライマー配列の一覧を表 1 に示す。得られた塩基配列もしくはアミノ酸配列をもとに、近隣結合法および最尤法で分子系統解析を行い、薬剤耐性変異等の出現、変遷について分析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 概要

2010 年 7 月から 2011 年 1 月までの間に、8 回に分けて、感染研インフルエンザセンターから計 306 件の RNA サンプルを受領し、A 型については NA と M 分節、B 型について

は NA 分節の塩基配列を決定した。重複分を除いた内訳は以下の通りである。

シーズン	型・亜型	受入数	成功数
2009/2010	A/H1N1pdm	73	71
	A/H3N2	38	37
	B	105	101
2010/2011	A/H1N1pdm	16	15
	A/H3N2	56	56
	B	13	13
合計		301	293

A/H1N1pdm の失敗例 3 例は A/H3 の誤同定の可能性が高い  
A/H3N2 の失敗例 1 例は B 型の誤同定の可能性が高い

## 2. A/H1N1pdm の変異解析

### NA 分節

NA 分節のアミノ酸配列についての最尤系統樹を図 1 に示す。比較のため、昨年度に感染研インフルエンザセンターとの共同事業で解析した流行初期（2009 年 5 月から 9 月）の株のデータを含めた。2009 年は初期流行の拡大に伴って V106I および N248D の変異を持つ株の増加が認められたが、この傾向は今年度に解析した株でも顕著であった。すなわち、2009/2010 年シーズン株（2009 年 10 月から 2010 年 9 月）では 1 株（A/Taiwan/23/2010）を除く 70 株が、2010/2011 シーズン株（2010 年 10 月から 2010 年 12 月）では 15 株のすべてが V106I および N248D の変異を持っていた。これらの中には M15I+N189S、G41E、N59K、S82P、V394I、T466I などの追加の変異を持つものがあり、多様化が進んでいることが認められたものの、特定の変異を持つ系統に収束する傾向は見られなかった。

2009/2010 シーズン株 71 株のうち 6 株が H275Y のオセルタミビル耐性変異を持っており、2010/2011 シーズン株 15 株の中にはオセルタミビル耐性変異は認められなかった。耐性変異は地理的にも系統的にも分散しており、散発的に発生したものとみられ

る。

### M 分節

M1 および M2 のアミノ酸配列は引き続き均質であり、初期分離株からのアミノ酸置換数は、最大でも、M1 で 1 個、M2 で 2 個であった。なお、解析した 86 株すべてが、M2 に S31N のアマンタジン耐性変異を持っており、H1pdm は発生以来一貫してアマンタジン耐性を保持しているものと思われる。ただし、イオンチャンネル近傍の 27 位に、従来は見られなかった V27F のアミノ酸置換を持つ株が 3 株（A/Osaka/60/1010, A/Myanmar/JP-S-001/2010, A/Myanmar/JP-S-004/2010）あり、これらは同時に P10H のアミノ酸置換を持っていた（他に P10H を単独で持つ株が 3 株あった）。アマンタジンの感受性に影響を与えている可能性もあり、引き続き監視が必要と考えられた。

## 3. A/H3N2 の変異解析

### NA 分節

2009/2010 シーズンは H3N2 の分離数は少なかった。2010 年 7 月までの分離株は、2010/2011 シーズンのワクチン推奨株（WHO）であった A/Perth/16/2009 株を基準として、367N、K369T、I464L のアミノ酸置換を持つ系統（A/Kumamoto/21/2010 等）と、D127N、I307M、L338F、N342D のアミノ酸置換を持つ系統（A/Taiwan/42/2010）に分けられた。8 月以降は、前者の系統にさらに R210K の変異を持つグループと、後者の系統にさらに N402D、R430S 変異を持つグループが顕著に増加した。特に 10 月以降は、解析した 33 株のうち 22 株が上記 2 つのいずれかのグループに属するものであった。

解析した 2009/2010 シーズン株 37 株、2010/2011 シーズン株 56 株の中には、E119V、R292K の薬剤耐性変異を持つものはなかった。

### M 分節

M1には変異の蓄積はほとんど見られなかった。一方M2にはV51AとN82Sのアミノ酸置換のいずれかまたは両方を持つ株が散見された。V51Aを単独で持つ株が5株、N82Sを単独で持つ株が6株に対し、両者を持つ株が6株であった。組み換えの可能性も含めてより詳細な解析が必要と考えられた。

なお、解析した93株すべてのM2にS31Nのアマンタジン耐性変異が見られた。

#### 全ゲノム解析に向けて

今シーズンのA/H3N2の解析の過程で、ウイルス増殖が極めて遅い株が多数見られており、HA活性の誤判定の原因ともなっている。内部タンパク質遺伝子の変異が増殖性に影響を与えている可能性が考えられるため、感染研インフルエンザセンターと協議し、今後H3N2の全ゲノム解析を実施することとした。手はじめとして、増殖の遅い株7株のRNAの提供を受け、全セグメントの塩基配列の決定を目指してプライマーの設計に着手した。

#### 4. B型の変異解析

2009/2010シーズンの国内分離株の90%以上がVictoria系統に属するNA文節を持っており、Yamagata系統はわずかであった。2010/2011シーズンは解析数が未だ少ないものの、前シーズンと同様の傾向を示し、特定の変異が蓄積する傾向も見られなかった。一方、中国本土分離株については、2009/2010シーズンはVictoria系統とYamagata系統がほぼ拮抗しており、2010/2011シーズンはこれまでの解析株7株のすべてがYamagata系統であった。なお、B型で既知の薬剤耐性変異を持つものはなかった。

#### D. 考察

A/H3N2のNA分節に特定のアミノ酸置換を持つ株(R210KおよびN402D+R430S)の増

加傾向が認められた以外は、いずれの型、分節においても、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。ただし、A/H1N1pdmのM2のイオンチャンネル近傍に見られた変異、A/H3N2のM2に見られた新規な変異など気になる点もあり、継続的な監視が必要と思われる。また、A/H3N2の増殖不全については、今後内部タンパク質遺伝子を含む全ゲノム解析を通して遺伝学的な背景の解明を目指したい。

#### E. 結論

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。A/H3N2で見られた増殖不全の原因を探るため、A/H3N2の全ゲノム解析に着手した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(研究課題に関連するもの)

1. Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan: Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 926-935, 2010.
2. Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, T., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Oguchi, A., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M. and Watanabe, H.: Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan. *PLoS One*, 10, e11057, 2010.
3. Ujike, M., Ejima, M., Anraku, A., Shimabukuro, K., Obuchi, M., Kishida, N., Hong, X., Takashita, E., Fujisaki, S., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y.,



Oguchi, A., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Influenza Virus Surveillance Group in Japan: Monitoring and characterization of Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-1010. *Emerg. Infect. Dis.*, in press, 2011. (DOI: 10.3201/eid1703.101188)

### (その他)

1. Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S., Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N. and Ohmori, M.: Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.*, **17**, 85-103, 2010.
2. Takaki, Y., Shimamura, S., Nakagawa, S., Fukuhara, Y., Horikawa, H., Ankai, A., Harada, T., Hosoyama, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N., Takami, H. and Takai, K.: Bacterial lifestyle in a deep-sea hydrothermal vent chimney revealed by the genome sequence of the thermophilic bacterium *Deferribacter desulfuricans* SSM1. *DNA Res.*, **17**, 123-137, 2010.
3. Nagata, Y., Ohtsubo, Y., Endo, R., Ichikawa, N., Ankai, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N. and Tsuda, M.: Complete genome sequence of the representative  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *J. Bacteriol.*, **192**, 5852-5853 2010.
4. Ichikawa, N., Oguchi, A., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kitani, S., Watanabe, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Kishi, E., Sasagawa, M., Ankai, A., Fukui, S., Hashimoto, Y., Kamata, S., Otaguro, M., Tanikawa, S., Nihira, T., Horinouchi, S., Ohnishi, Y., Hayakawa, M., Kuzuyama, T., Arisawa, A., Nomoto, F., Miura, H., Takahashi, Y. and Fujita, N.: Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216<sup>T</sup>; An evolutionary snapshot of the family *Streptomycetaceae*. *DNA Res.*, **17**, 393-406, 2010.
5. Izumiya, H., Sekizuka, T., Nakaya, H., Taguchi, M., Oguchi, A., Ichikawa, N., Nishiko, R., Yamazaki, S., Fujita, N., Watanabe, H., Ohnishi, M. and Kuroda, M.: Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 623-630, 2011.
6. Awakawa, T., Fujita, N., Hayakawa, M., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S.: Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. *ChemBioChem*, in press, 2011 (DOI: 10.1002/cbic.201000628)
7. Uchida, K., Moon-Sun, J., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Hayakawa, M., Fujita, N. and Aizawa, S.: Characterization of spore flagella in *Actinoplanes*

*missouriensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press, 2011. (DOI:10.1128/AEM.02061-10)

## 2. 学会発表

### (研究課題に関連するもの)

1. 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、徳島、11 月、2010 年。

### (その他)

1. Nagata, Y., Natsui, S., Ohtsubo, Y., Oguchi, A., Ankai, A., Ichikawa, N., Fujita, N. and Tsuda, M.: Organization and dynamism of gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26 genome. 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition "Biotechnology for the Sustainability of Human Society", Italy, September, 2010.
2. 川越暁、中澤秀和、深田純司、笹川真稚、片野葉子、中村早苗、細山哲、佐々木敬樹、花田智、鎌形洋一、中村和憲、山崎秀司、藤田信之：ポリリン酸蓄積細菌 *Microclunatus phosphovorius* NM-1<sup>T</sup> の全ゲノム解析。第 62 回日本生物工学会大会、宮崎、10 月、2010 年。
3. 市川夏子、澤野寿彦、関川智洋、山崎秀司、藤田信之：NITE における微生物ゲノム解析と微生物ゲノムデータベース DOGAN のリニューアル。ライフサイエンス統合データベースシンポジウム「ライフサイエンスの未来へ。10 年先のデータベースを考える」、東京、10 月、2010 年。
4. Ichikawa, N., Sawano, T., Sekigawa, T., Nakazawa, H., Ohji, S., Yamazaki, S. and Fujita, N.: Bacterial genome annotation at NITE and annotator-oriented development of annotation workbench. 4th International Biocuration Conference, Tokyo, October, 2010.
5. 山田佐知子、中村早苗、市川夏子、宝田裕美、伊藤尚文、片野葉子、細山哲、山田隆一、中澤秀和、山崎秀司、藤田信之：重金属耐性能を持つ好酸性光合成細菌 *Acidiphilium multivorium* AIU301<sup>T</sup> のゲノム解析。第 5 回日本ゲノム微生物学会年会、仙台、3 月、2011 年。
6. 藤浪俊、笠井宏朗、堀川博司、加藤裕美子、原田、細山哲、関根光雄、宝田裕美、宮澤せいはい、中澤秀和、藤田信之：新規海洋性アクチノバクテリア YM16-304 株の全ゲノム解析。第 5 回日本ゲノム微生物学会年会、仙台、3 月、2011 年。

## G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 プライマー一覧

分節	Type	subtype	用途	Original 名	配列	備考	
NA	A	H1N1pdm	RT	Uni12	AGCAAAAGCAGG		
			PCR	NA_1F_cdc	AGCAAAAGCAGGAGT	PCR primer set	
				NA_5R_cdc	AGTAGAAACAAGGAG		
				NA-PCR1	ATGAATCCAAACCAAAGATAATAAC		
			Seq	NA_5R_cdc	AGTAGAAACAAGGAG	PCR 予備	
				NA-seq1	CAATTGGAATGGCTAAC		
				NA-seq2	TGGATGGGCTATATACAG		
				NA-seq3	ATCGAACCCCTAATGAGC		
				NA-seq4	GAACACAAGAGTCTGAATG		
				NA-seq5	GATAACTGGCATGGCTC		
				NA-seq6	GTTTTGAGATGATTTGG		
				NA-seq7	TTCTGGGTTGAACCTAATC		
				NA-seq8	CAAGACCAACCCACAG		
				NA-seq9	GCTTTATTGAGAAGTTATTG		
				NA-seq10	TGCATATGTATCCTATCTG		
	NA-seq11	GATCTTGTATGAGCCTG					
	NA-seq12	AATTGATGCCATCATGAC					
	NA-seq13	GAATGGTTCCCTTATGAC					
	NA-seq14	AATCTGATTTTGATTCCC					
	NA-PCR1	ATGAATCCAAACCAAAGATAATAAC					
	NA-PCR3	TTGTCAATGGTAAATGGCAAC					
	B	A	H3N2	RT	Uni12	AGCAAAAGCAGG	
				PCR	H3N2-F1	AGCAAAAGCAGGAGT	PCR primer set
					H3N2-R1413	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	
					Ba-NA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGAGT	
				PCR	Ba-NA-1413R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	PCR 予備
					H3N2F	AGCAAAAGCAGGAGTGAAAATGAA	PCR 2 分割 (予備)
					N2-AN2D2R	CAAAGGCCAGCCTTTCACT	
					N2-F754	TGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAA	
					H3N2-R1413	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	
		Seq	H3N2-Fv2		AGCAAAAGCAGGAGTAAAGATGAA		
			N2-F458-475	CGGACCCCTATTGATGAATGA			
			N2-R538	CCATCGTGACAACCTGAGCT			
N2-F988			GACAGCTCCAGCAGTAGCC				
N2-AN2D2R			CAAAGGCCAGCCTTTCACT				
H3N2-R			TTCTAAAATTGCGAAAAGCTTATAT				
N2-F35-47			AAGATAATAACAATTGGCTCTG				
N2-F387			CATGCGATCCTGACAAGTGTATC				
N2-R579-545			CAACTTGAGCTGGACCATGCTAT				
Seq	N2-R421-398	CCAAGGGCAAATTGATAACACTTG					
	N2-F754	TGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAA					
	N2-F948-969	ATAGCATTGTTCCAGTTATGT					
	N2-R1108-1086	CCCATCCACAGTCAATCCAT					
	N2-R1405-1382	CGCCCCATCAGGCCATGAGCCTGT					
	B			RT	Buni10	AGCAGAAGCR	
				PCR	BNA-F5v2	TCAAACTGAAGCAAATAGGCCA	PCR primer set
					BNA-R1498-1472	AATAGGAACAAGGGTTTAGAACAGA	
					BNA-F5v2	TCAAACTGAAGCAAATAGGCCA	
BNA-END			AGTAGTAACAAGAGCATTTT				
BNA-F5v2			TCAAACTGAAGCAAATAGGCCA				
Seq			BNA-R1461	CAAAGGGTTTAGAACAGA	PCR 予備 2		
			BNA-F5v2	TCAAACTGAAGCAAATAGGCCA			
			BNA-F355	AAACTCAGCTCCCTTGAT			
	BNA-R433-411	CATTCCTTTGGTCCACAAGCAA					
	BNA-F717	TGCCTGCAATTGCATCGG					
	BNA-R953-929	CTTTTTGCTGTGAAGTGTATCT					
	BNA-R1498-1472	AATAGGAACAAGGGTTTAGAACAGA					
	BNA-F45-67	AATGAACAATGCTACCTCAAC					
	BNA-R282	TATGTCCACTCCGGTTCT					
	BNA-R557-537	TCTACAGTTGGTATTTTGGC					
	BNA-F937-950	TTACACAGCAAAAAGACCCTTTG					
	BNA-R1092	ACAAATCCTCCCTTGAT					
	BNA-R1403-1389	GCCATTTACTGTTTAAATGGGCTCA					

分節	Type	subtype	用途	Original 名	配列	備考
M	A	H3N2	RT	Uni12	AGCAAAAGCAGG	
			PCR	AMA-M1-2v2	TCAGGGAGCAAAGCAGGTAGATA	PCR primer set
				AMA-Bm-M-1027R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTT	
				AMA-M1-2v2 AMA-M-1027R	TCAGGGAGCAAAGCAGGTAGATA AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC	
			Seq	AMA-M1-2	AGCAAAAGCAGGTAGATATTG	
				AMA-379-400F	GTTATTCTGCTGGTGCACTTGC	
				AMA-588-607R	CCAGCCATTGTGCCATAGC	
				AMA-M-1027R	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC	
				AMA-12-31F	GGTAGATATTGAAAGATGAG	
		AMA-348-368F		ACATTCCATGGGGCCAAAGAA		
		AMA-571-595R		TCCATAGCCTTAGCTGTAGTGCTGG		
		AMA-981-1002R AMA-981-1002R AMA-960-984R		CAGCTCTATGCTGACAAAATGA CAGCTCTATGCTGACAAAATGA ATGACTGTCGTCAGCATCCACAGCA		
		RT	Uni12	AGCAAAAGCAGG		
		PCR	M_1F_cdc	AGCAAAAGCAGGTAG	PCR primer set	
			M_3R_cdc	AGTAGMAACAAGGTAGT		
			MP-5ePF1	AGCAAAAGCAGGTAG		PCR 予備
			MP-5ePR2	TAGMAACAAGGTAGTTTT		
		Seq	MP-seq1	CCCTCAAAGCCGAGAT		
			MP-seq2	CCTAAATGGGAATGGG		
MP-seq3	GAACAGATTGCTGATTC					
MP-seq4	GGGACTCATCCTAGCTC					
MP-seq5	TTATCGTCGCTTTAAATAC					
MP-seq6	TCTGCTGTTCTGTTG					
MP-seq7	CCATTGCTTCTGGTAG					
MP-seq8	CAGCACCATTCTGTTTTC					
MP-seq9	CGTTATTTCTTTTTGAGC					
MP-seq10	AGCCATTCCATGAGAGC					
MP-PCR1	GAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC					
MP-PCR3	CTCTAGCTCTATGTTGACAAAATGACC					

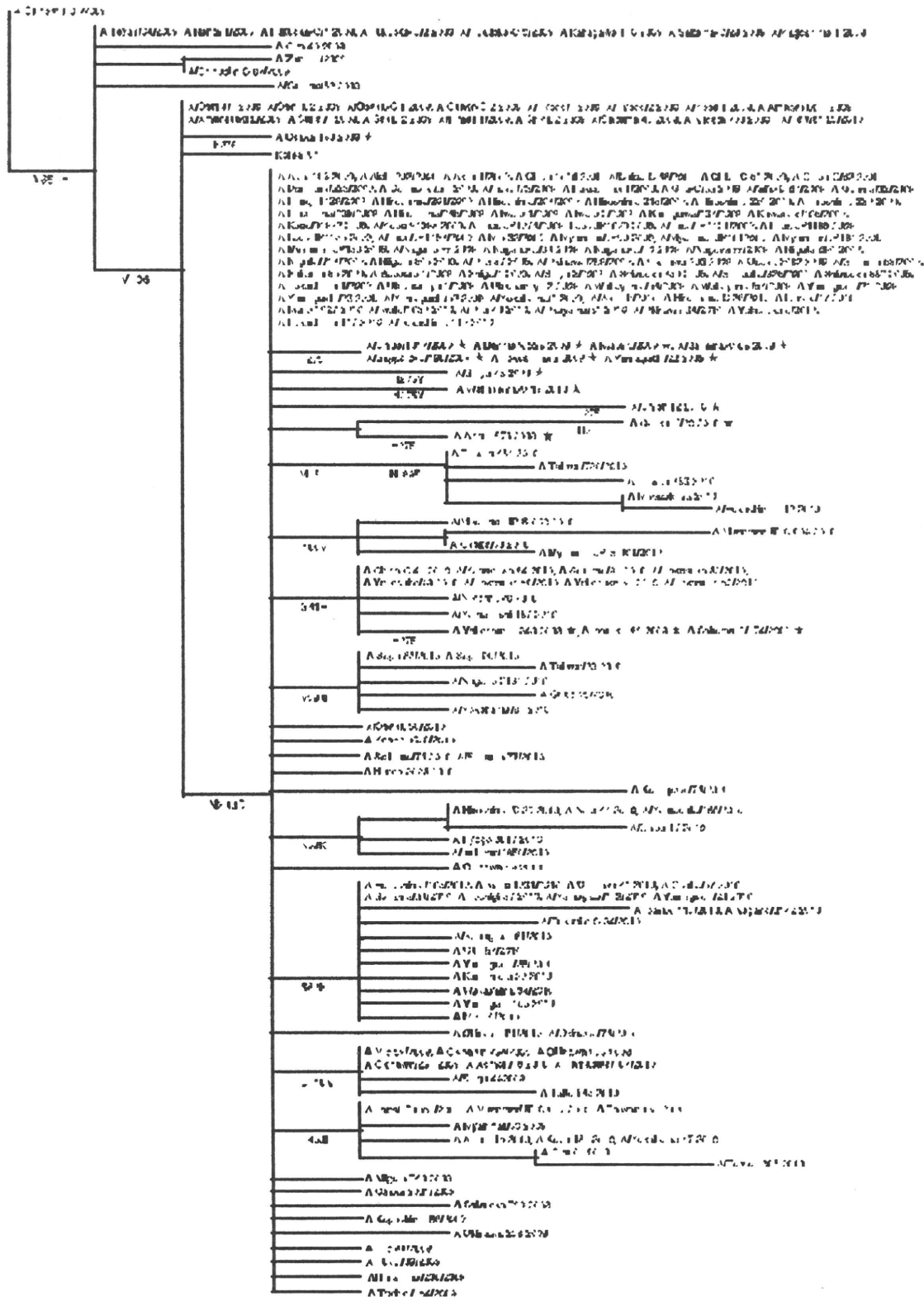


図1 A/H1N1のNA分節のアミノ酸配列による最尤系統樹  
 黒字：2009年5月～2009年9月（流行初期）  
 青字：2009年10月～2010年9月（2009/10シーズン）  
 赤字：2010年10月～2010年12月（2010/11シーズン）