

A. ①より別紙方法に従い 10 倍階段希釈液の作製を行い、各地衛研の SOP に従って Type A(M 遺伝子)および H5 亜型(HA 遺伝子)の検出を行い、各希釈列の Ct(Cp)値の算出を行って下さい。

B. 各地衛研の SOP に従って(各地衛研で使用している陽性・陰性コントロールを含む)、②に対する亜型同定検査を実施し、各検体の Ct(Cp)値の算出を行い亜型同定を行って下さい。

C. ③より、各地衛研の SOP に従って RNA の抽出を行って下さい。抽出した RNA を用いて、各地衛研の SOP に従って Type A(M 遺伝子)および H1pdm09 (HA 遺伝子)の検出を行い、各検体の Ct(Cp)値の算出を行って下さい。

なお、B、C の検査は必ずしも同時に行う必要はありません。又 B、C の検査は 2 回以上に分けて行っても構いません(例えば 1 回目は Type A と H5 のみで、2 回目以降に他の亜型の同定検査を行うなど、必ず各地衛研の SOP に従って検査を行って下さい)。また、各アッセイを行う際には、必ず A を行って下さい。

(注意点)各地衛研の SOP において、検査を Duplicate で行う事になっている場合は、上記 B、C は各地衛研の SOP に従い Duplicate にて行って下さい(RNA 抽出も Duplicate で行っている場合は Duplicate にて行き、「結果記入シート」の特記事項にその旨を記載し、「結果記入シート」を改変して、Duplicate で行った結果をご記入下さい。また、測定のみを Duplicate で行っている場合は、「結果記入シート」を改変して、Duplicate で行った結果をご記入下さい。また、A に関しては必ずしも Duplicate で行う必要はありません。検査回数が 2 回以上になる場合は、2 回目以降では A を改めて作製してから検査を行ってください。リアルタイム PCR 機が複数ある場合で、A を作製後 1 時間以内に使用するのであれば、改めて A を作製し直す必要はありません。

5. 各地衛研で行っている試験方法等について、次の項目に関するアンケートがありますので、入力例 (Excel ファイル「結果記入ファイル」の「アンケート記入入力例」シート)を参考にして「アンケート記入欄」シートにご回答下さい。

- ①研究所・担当者情報について
- ②検体輸送状況について
- ③検体からの RNA 抽出について
- ④プライマー/プローブセットについて
- ⑤RNase Inhibitor の使用について
- ⑥リアルタイム RT-PCR 試薬について
- ⑦反応組成について
- ⑧反応温度およびリアルタイム PCR 機種名について
- ⑨反応プレートについて
- ⑩ピペッター・チップの使用について
- ⑪診断のフローチャート
- ⑫その他(特記事項、意見、コメント等自由記載欄)

6. 結果報告の際の注意事項

入力例(Excel ファイル「結果記入ファイル」の「結果記入入力例入力例」シート))を参考にして、試験結果を「結果記入(1回目)」シートに記入して下さい。2回以上試験を行った場合は、それぞれの「結果記入(2～4回目)」シートに試験結果を記入して下さい。5回以上試験を行った場合は、「結果記入」シートをコピーして記入して下さい。

添付書類 2

インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)の外部 精度管理(EQA)実施結果(抜粋)

参加地衛研数: 11

のべ検査回数: 27 (最小 1 回、最大 6 回)

① 亜型同定用 RNA 抽出液(A-G)の検査結果の集計表

サンプル毎の検出率

サンプル名		RNA 液希釈液	地衛研数 (検出率)	
亜型同 定用 RNA 抽 出液	A	1.5mL チューブ (赤)	H1pdm	11/11 (100%)
	B	1.5mL チューブ (青)	H1pdm (A の 10^{-3} 希釈)	11/11 (100%)
	C	1.5mL チューブ (白)	H3	11/11 (100%)
	D	1.5mL チューブ (黄)	H3 (C の 10^{-3} 希釈)	10/11 (91%)
	E	1.5mL チューブ (緑)	DW	9/11 (82%)
	F	1.5mL チューブ (橙)	H5	11/11 (100%)
	G	1.5mL チューブ (無)	H5 (F の 10^{-2} 希釈)	9/11 (82%)

	サンプル A-G 検出の正答率	判定できなかった理由	地衛研数
最初の検査で 結果判定	7/7 (100%)		4
	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	2
	6/7 (85.7%)	陰性を陽性または判定不能と判断	2
他の方法と合わせて 結果判定	7/7 (100%)		1
1 回以上の再検査を 行って 結果判定	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	1
	6/7 (85.7%)	陽性を陰性と判断	1

濃度の異なる(二つのうち一つは検出限界付近の濃度)ウイルス RNA の亜型(H1pdm, H3, H5)を正確に同定できるかどうかを確認するために、サンプル A-G を用いて各地衛研で検討

していただいた。

濃い濃度のサンプル(A, C, F)に対しては全ての地衛研で正確に型・亜型判定ができていたが、濃度の薄いサンプル(B, D, G)に対しては Type A の検出はできているが、サンプル D (H3)に対して亜型同定ができなかったケースが 1 件、サンプル G (H5)に対して亜型同定ができなかったケースが 1 件あった。また、サンプル B と D に対して、リアルタイム RT-PCR では亜型同定ができず、conventional RT-PCR または nested RT-PCR により亜型同定を行ったケースが 2 件(1 地衛研)あった。他にもサンプル G について再検査を繰り返したものの、結局は陰性と判断したケースが 1 件あった。

濃度の薄いサンプル(B, D, G)に対してリアルタイム RT-PCR により亜型同定ができないあるいは判定が困難だったケースでは、Type A と各亜型の Ct(Cp)値を比較すると、Type A よりも検出できなかった各亜型の Ct(Cp)値が高く出ている傾向にあった。すなわち、プライマーやプローブの劣化など何らかの問題により各亜型の検出感度が Type A よりも低いために、各亜型の Ct(Cp)値の立ち上がりが見られず、亜型同定まで至らなかったのではないかと考えられる。

なお、サンプル E(DW)に対して、Type A/H5 とともに陽性と判断したケースが 1 件、Type A 陰性/H5 陽性で判定不能と判断したケースが 1 件あった(図 4 および図 5 参照)。どちらのケースも、他のサンプルはほぼ正しく検出できており、分注ミス(採取したサンプルを間違えた)あるいは操作途中で、何らかの原因によりサンプル間のコンタミネーションが起きたため、このような結果になったと考えられる。遺伝子検査ではコンタミネーションのリスクが常にあるため、そのリスクを減らす工夫が検査の全行程に必要ではないかと考えられる。

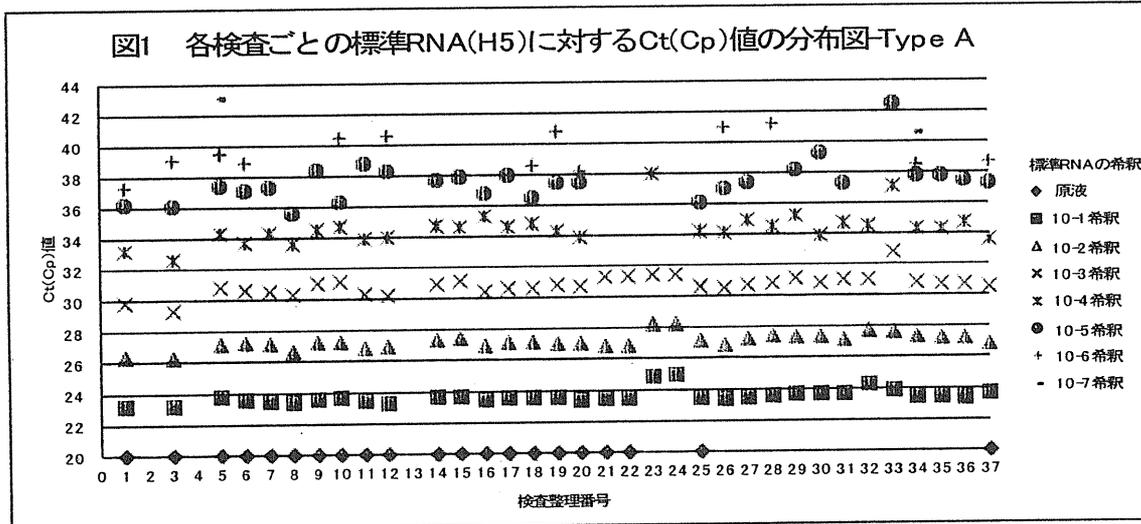
各地衛研が通常使用している陽性コントロールについては、各亜型の検出系で比較的濃度の濃い 1 点のみを陽性コントロールに採用している地衛研が 4 カ所あった。この場合、検査ごとの検出限界を確認する事はできないので、検出系の感度低下が起きているかどうかを見るためにも、検出限界付近を含むように陽性コントロールを複数検査毎に置くことが望ましいと考えられる。

参考までに感染研で行った検査レイアウトおよび検査結果を添付(「感染研 Ct 値結果一覧表」)します。

② 標準 RNA の各希釈に対する Type A 検出系の Ct(Cp)値の比較

配布した標準 RNA 原液の Type A 検出による各地衛研の Ct (Cp)値を全て「20」に換算した値を用いて解析を行った。換算後の値は各地衛研毎に送付した「Ct 値結果一覧表(地衛研名)」および「EQA クラフ集計(地衛研名):グラフ A」をご参照下さい(各地衛研の検査整理番号はその中に記載されています)。なお、原液を測定しなかった地衛研については、他のポイン

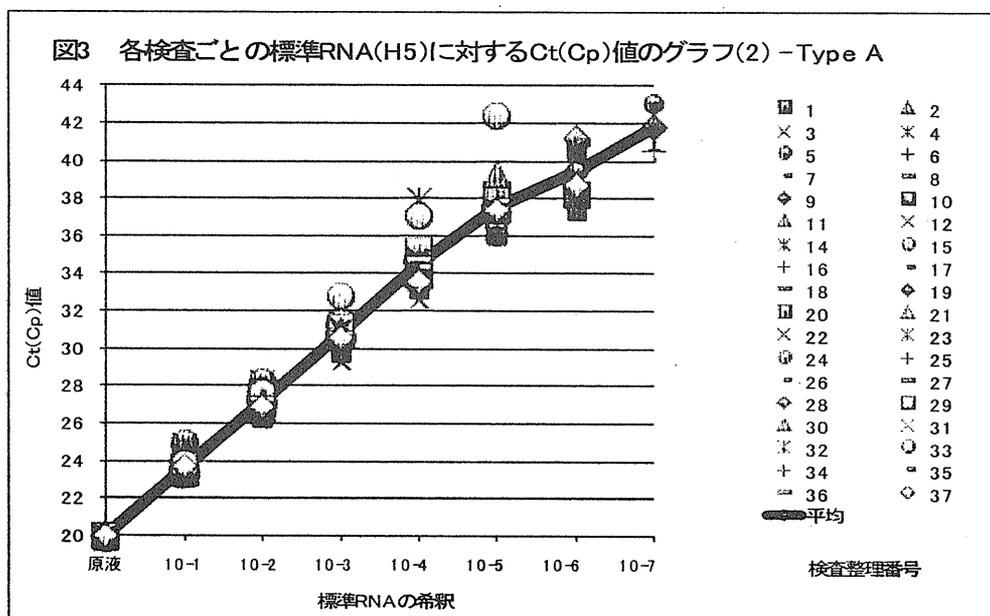
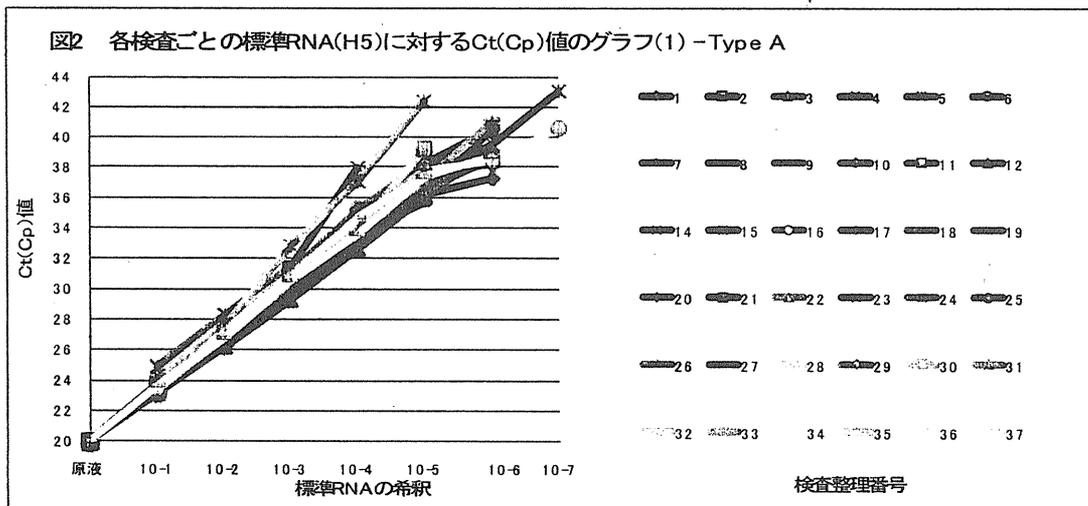
トを用いてスタンダードを描き、その傾きから原液の Ct (Cp) 値を推定した値を「20」に換算して解析を行った（解析時にはこれらの推定値を除外した）。各地衛研で行った Ct (Cp) 値の散布図を図1に示した。



Type A の検査は全ての地衛研が「感染研マニュアルの Type A」を採用しており、一カ所の地衛研ではその他のプライマーセットによる検査法も併用していた(その結果は各図には含まれていない)。

Type A の検査(感染研マニュアルの Type A)は 11 地衛研で、のべ 36 回行われた。図 1 の検査整理番号は各地衛研で行った検査をそれぞれ示している(結果はランダムに並んでいます)。各地衛研の結果は地衛研毎にお知らせする検査整理番号をご参照下さい。感染研の検査整理番号は「14」になります)。10-4 希釈までは全ての地衛研で検出ができていますが、10-5 希釈は一部の地衛研で検出できていなかった。

原液の Type A の Ct(Cp) 値を 20 とした時、10-5 希釈の Ct(Cp) 値分布の平均は 37.6 であった。理論上この希釈濃度であれば確実に検出できる範囲と考えられる(10 回検査を行って 10 回とも確実に検出できるという意味)が、この希釈における地衛研間の Ct(Cp) 値は、他の濃い希釈液よりもばらつきが大きかった。検査整理番号毎に、Ct(Cp) 値をプロットして検量線を描いたグラフを図 2 に、平均値とともにプロットしたグラフを図 3 に示した。



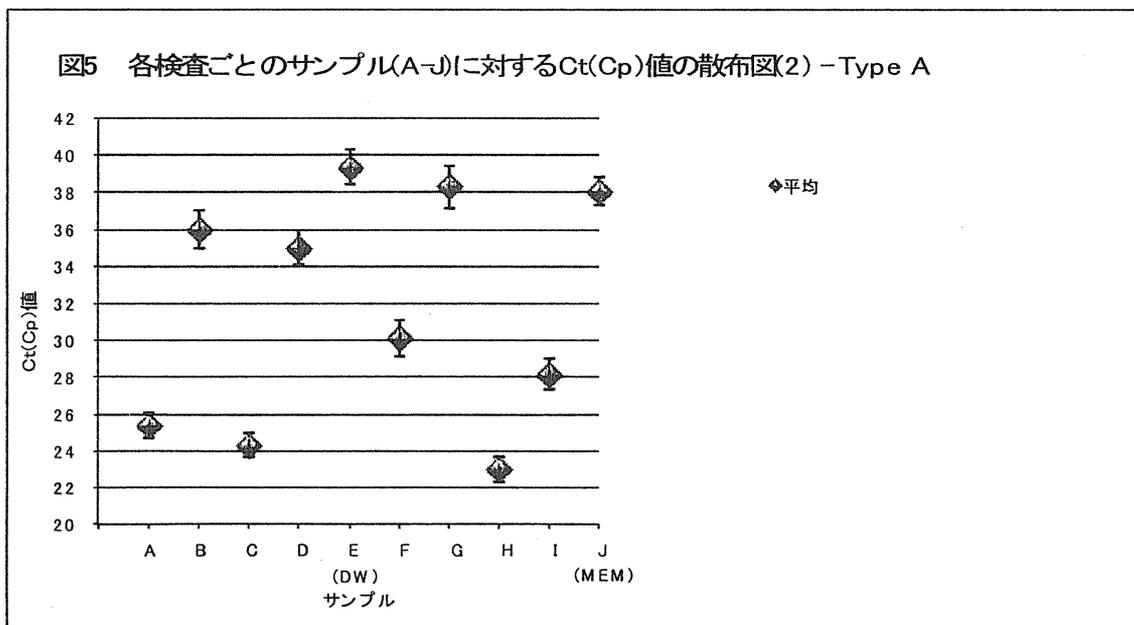
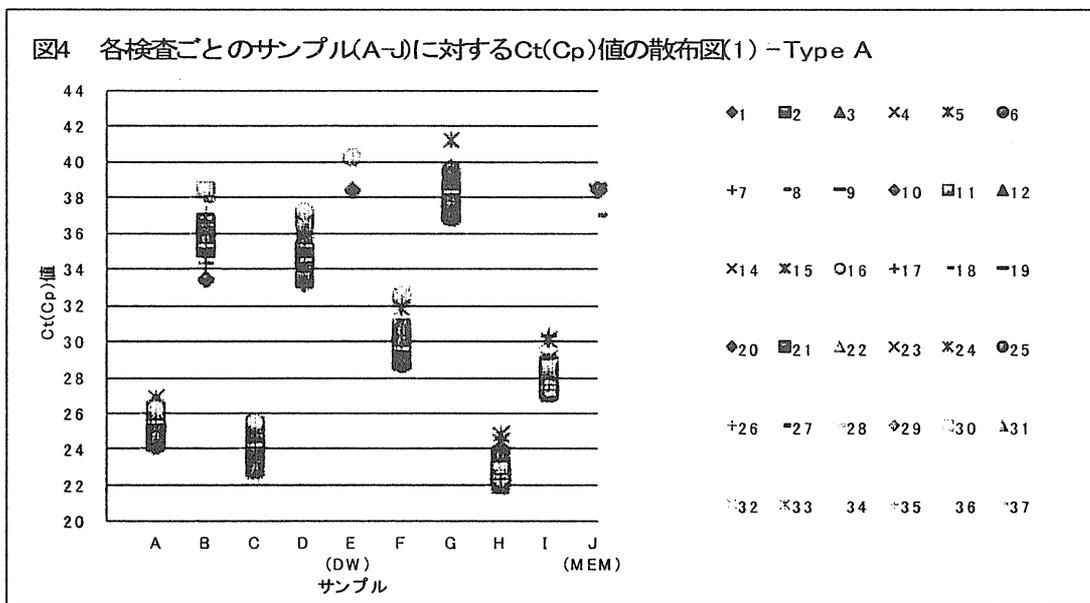
一部の試験を除いて10-5希釈まではほとんど同じCt(Cp)値の分布となり、それぞれのプロットを結ぶと直線性が見られた。すなわち、この濃度まではこの検査系は定量性を有していると考えられる。ほとんどの地衛研では10-5希釈までこの検量線の直線性が保たれており、Type Aの検出はほぼ問題無く行っていると考えられる。しかし、この検量線の傾きが大きかったり、比較的濃度の濃い10-4希釈までしか検量線の直線性が保たれていなかったりして、Type Aの検出系に何らかの問題があるケースもあった(トラブルがあると考えられるケースについては、個別に対応します)。

なお、10-6希釈では約1/3の検査でしかCt(Cp)値が得られていないが、この時の10-6希釈のCt(Cp)値分布の平均は39.4であり、理論的には検出できたり、できなかったりする範囲にあると考えられる(10回検査を行っても10回とも確実に検出するとは限らないという意味)。検量線(図2)を描いても10-5希釈までの直線性の検量線からは外れ、ばらつきも他の濃度と

比べて大きくなっている。すなわち、10⁻⁶ 希釈液はこの系においては定量性を有していないと考えられ、例えばこの濃度について 10 回の検査を行ったとしても、Ct(Cp)値が得られたり、得られなかったりする場合があると考えられる。これらはただ単にその時に希釈したタイミングで、「RT-PCRで増幅する量のテンプレートRNAが偶然入っていた」か「入っていない」かの違いを見ているだけで、すなわちこの希釈濃度はこの系における検出限界付近あるいはそれを少し超えた濃度と考えられる。

③ 検査毎のサンプル(A-J)に対する Type A の Ct(Cp)値 の比較

サンプル(A-J)に対する Type A の Ct(Cp)値の分布を図 4 にその平均値を図 5 に示した。



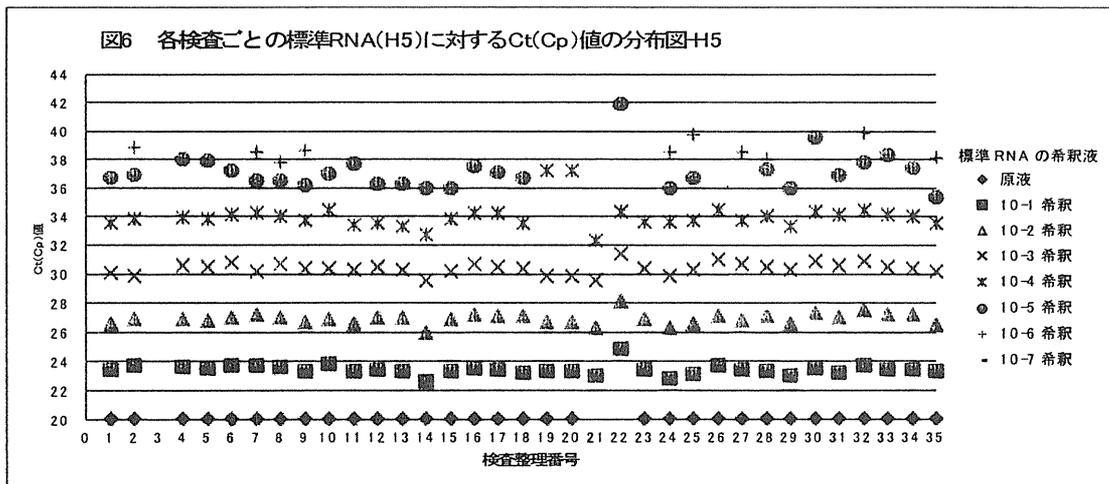
サンプル A-G においては、RNA 濃度の薄い方が濃い方と比べて Ct(Cp)値のばらつきが大きい(A, C, F vs B, D, G)。感染研のマニュアルの A 型・各亜型の同定方法は、同じサンプルであれば Type A と各亜型の Ct(Cp)値がほとんど同じになるように設計してあるので(「感染研 Ct 値結果一覧表」をご確認下さい)、Type A よりも各亜型の Ct(Cp)値が高く出るようであれば、その亜型の検出系の検出感度は Type A よりも低いと考えられる。このため検出限界付近のサンプルでは Type A は検出できても、亜型同定できないという可能性が高くなる。この場合は、各亜型の検出系でプライマーやプローブの劣化など何らかの問題が起きている可能性が高いと考えられる(Type A の検出系が各亜型の検出系より Ct(Cp)値が高く出る場合も同様である)。

④ 標準 RNA の各希釈に対する H5 検出系の Ct(Cp)値の比較

配布した標準 RNA 原液の Type A 検出による各地衛研の Ct (Cp)値を全て「20」に換算すると、各地衛研で行った H5 検出系の Ct (Cp)値にばらつきが見られた(最小 18.13、最大 21.80)。先述したように、Type A と H5 亜型の Ct(Cp)値は同じサンプルであればほとんど同じになるように検出系は設計されているので、これらの差違が大きいようであれば(テンプレートを希釈した際にその差異がますます大きくなるなど)、Type A あるいは H5 のどちらかの検出系にプライマーやプローブの劣化など何らかの問題が起きている可能性が高いと考えられる。

上述したように、Type A の Ct (Cp)値を全て「20」に換算すると、H5 と Type A の差違が大きいところでは解析ができないため、H5 の検出系に関しても、配布した標準 RNA 原液の H5 検出による各地衛研の Ct (Cp)値を全て「20」に換算した値を用いて標準 RNA の各希釈に対する H5 検出系の Ct(Cp)値の解析を行った。

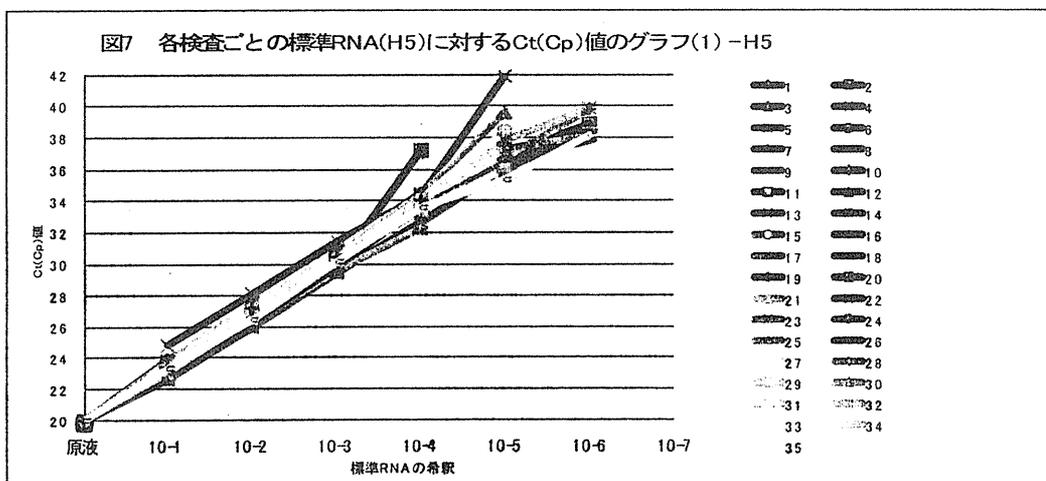
なお、H5 検出系で換算後の値は「H5 集計(換算後)一覧」をご参照下さい。原液を測定しなかった地衛研については、他のポイントを用いてスタンダードを描き、その傾きから原液の Ct (Cp)値を推定してその値を「20」として換算して解析を行った。各地衛研で行った H5 検出系の Ct(Cp)値の散布図を図 6 に示す。



H5 の検査は 9 地衛研が「感染研マニュアルの H5 2011 年 2 月追加 ver.」を 2 地衛研が「同 H5 2008 年 10 月 ver.2.1」を利用していた。一カ所の地衛研ではその他のプライマーセットによる検査法も併用していた(その結果は各図には含まれていない)。

H5 の検査(感染研マニュアル)は 11 地衛研で、のべ 34 回行われた。Type A と同様に 10-4 希釈までは全ての地衛研で検出ができていますが、10-5 希釈は 2 カ所の地衛研で検出できていなかった(2 カ所とも H5 2008 年 10 月 ver.2.1 を採用。他の地衛研では全て検出できている)。

原液の H5 の Ct(Cp)値を 20 とした時、10-5 希釈の Ct(Cp)値分布の平均は 37.1 であった。Type A と同様にこの希釈濃度は、理論上は確実に検出できる範囲と考えられる(10 回検査を行って 10 回とも確実に検出できる)が、地衛研間の Ct(Cp)値は、他の濃い希釈液よりもばらつきが大きい。検査整理番号毎に、Ct(Cp)値をプロットして検量線を描いたグラフを図 7 に、平均値とともにプロットしたグラフを図 8 に示した。



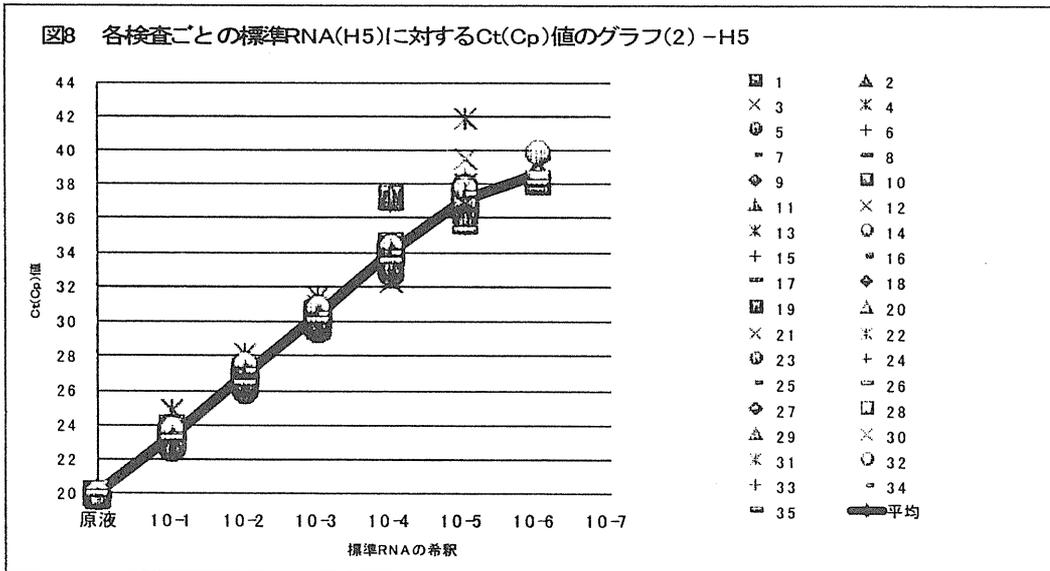
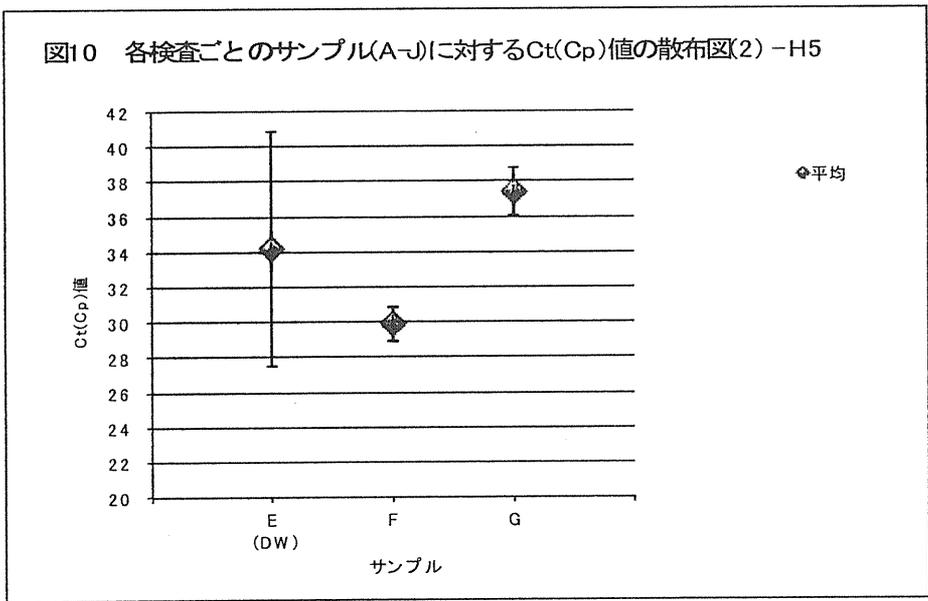
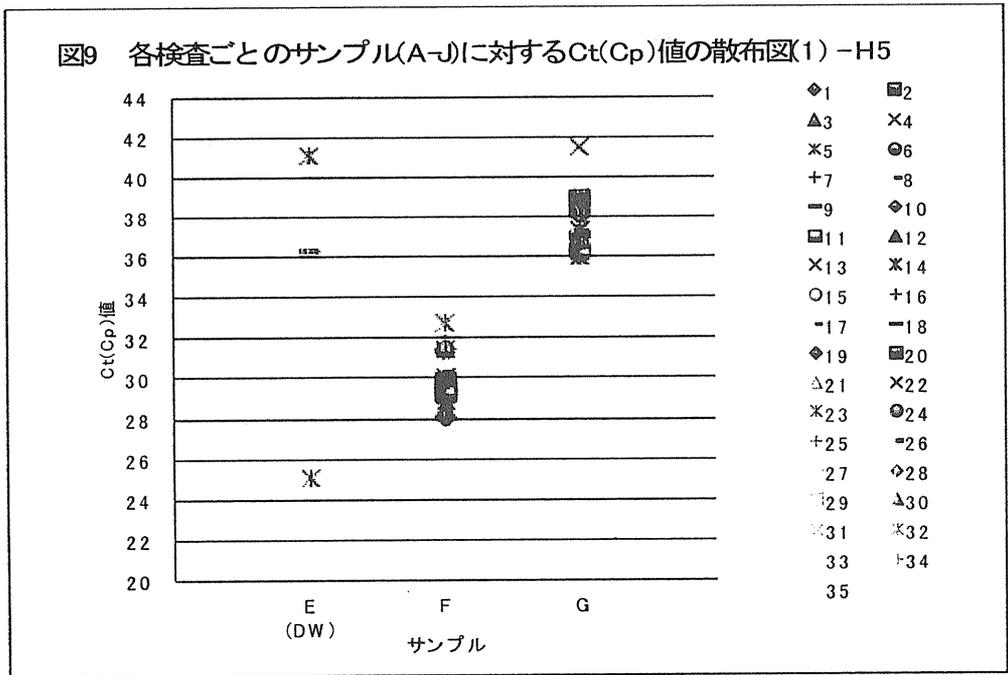


図7および図8に対する解説は、Type Aの解説と同様である。(図2および図3に相当)。2011年2月追加 ver.を採用している地衛研では、ほとんどが、10⁻⁵希釈まで検量線の直線性が保たれており、H5の検出系はほぼ問題無く行えていると考えられる。しかし、この検量線の傾きが大きかったり、比較的濃度の濃い10⁻⁴希釈までしか検量線の直線性が保たれていなかったりして、H5の検出系に何らかの問題があるケースもあった(トラブルがあると考えられるケースについては、個別に対応します)。

なお、地衛研毎のType AとH5検出系のCt(Cp)値の差違は2011年2月追加 ver.を採用している場合は、最大で1.38、最小で0.15、平均で0.56であった。2008年10月 ver.2.1を採用している場合は、最大で1.80、最小で1.48、平均は1.64であった。2008年10月 ver.2.1は今回配布した標準RNAを用いた場合Type AとH5のCt(Cp)値が解離することが既に明らかになっており、ウイルス株によっては検出感度に影響する場合がありますので、2011年2月追加 ver.へ変更するようお願いいたします。また、③で前述したように、Type AとH5のCt(Cp)値が大きく解離する場合は、プライマーやプローブの劣化など何らかの問題が起きている可能性が高いと考えられる。

⑤ 検査毎のサンプル(E-G)に対するH5のCt(Cp)値の比較

サンプル(E-G)に対するH5のCt(Cp)値の分布を図9にその平均値を図10に示した。



サンプル E(DW)に対して、H5 検出系で Ct(Cp)値を検出したケースが 3 件あり、うち 2 件は Ct(Cp)値も低く陽性と判断していた。これらのケースは前述したように、サンプルの入れ間違いか何らかのコンタミネーションによる偽陽性と考えられた。サンプル F と G においては、Type A と同様に H5 でも RNA 濃度が薄い方が濃い方と比べて Ct(Cp)値のばらつきが大きい(F vs G)。Type A と同様に H5 の検量線がぶれている場合は、RNA 量の少ないサンプルでは H5 亜型同定ができなくなる可能性が高いと考えられる。

⑥ RNA 抽出効率の差違

各地衛研の方法でサンプル H-J に対する RNA 抽出を行い、Type A および H1pdm の検査結果の比較によりキット間や施設毎に RNA 抽出効率の差違があるかどうかの確認を行った。各地衛研が使用している RNA 抽出キットおよびサンプル量と RNA の抽出量などについて下記一覧にまとめた。

キット名(メーカー名・コード番号):	地衛研数
High Pure Viral RNA kit (Roche: Cat# 11 858 882 001)	2
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN: Cat# 52904 または 52906)	8
無回答(磁気ビーズ法)	1

結果的にはサンプル H およびサンプル I (H の x25 希釈) は、全地衛研において TypeA および

RNA 抽出時の RNA 濃縮率(倍)	サンプル使用量/抽出量(μ L)	地衛研数	よび H1pdm の どちらも 陽性と判 断されて いる。今 回送付し
4.0	200/50	2	
3.1	200/65	1	
2.3	140/60	6	
2.0	200/100	1	
2.0	140/70	1	

たウイルス濃度は比較的濃かったため TypeA の Ct(Cp) 値の平均はサンプル H で 23.0、サンプル I で 28.2 と Ct 値の値は小さく、地衛研間でのばらつきもほとんどなかった。サンプル濃縮率は地衛研間で最大 2 倍の差があるが、それを反映したとしても Ct(Cp) 値は理論的には“1”しか変わらないため、今回配布したような比較的濃度の濃いサンプルでは、RNA の抽出効率を評価する事はできなかった。

サンプル中の RNA 量が多い場合は、各キットに RNA 抽出効率の違いがあったとしても、検出率には影響しないが(もしあったとしても RNA 濃度が高いので、検査では陽性となる)、もし RNA の抽出効率に差がある場合は、サンプル中の RNA 濃度が低い時に、検出率に大きく影

響する事になるので、この点を評価する事は非常に重要である。もし、次回 EQA を行う場合は、より検体中のウイルス量を少なくしたものも配布して評価を行う必要があると考えられた。その場合、検出系の精度を考慮した上で、検出率に差が出るようであれば、RNA の濃縮率、RNA 抽出キット、RNA の溶出容器の影響などを評価する事も可能になるのではないかと考えられる。

抗インフルエンザ薬耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの検出と 薬剤感受性試験系の改良について

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

世界各国で分離されている A(H1N1)pdm09 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共同で、2009 年 9 月から A(H1N1)pdm09 ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施している。2010/11 シーズンにはサーベイランスが、47 都道府県、71 地衛研/保健所に拡充し、日本全域における薬剤耐性株の発生状況を迅速により正確に把握することが可能になった。2010/11 シーズンにおけるオセルタミビル/ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 株の検出率は 2.0%であり、シーズン毎にわずかながら検出率の増加傾向が認められた。また、薬剤の未投与例から検出される耐性株の割合は 44%を占め、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。今後も引き続き、薬剤耐性株の発生状況について注意深く監視を続ける必要がある。さらに、薬剤感受性試験系を改良し、より精度高く耐性株を検出するには、化学発光法ではなく蛍光法が適していることを明らかにした。2011/12 シーズンは、すべての解析株について蛍光法により薬剤感受性試験を実施することで、試験の効率と精度の上昇が期待される。

A. 研究目的

2009年にメキシコ、米国で出現した A(H1N1)pdm09ウイルスはその後、日本を含む世界各国に広がり、パンデミックを起こした。2010年8月には、WHOによってパンデミック期からポストパンデミック期への移行が宣言されたが、A(H1N1)pdm09ウイルスはその後、A香港型およびB型ウイルスと混在して流行し

ており、世界各国でウイルスが検出されている。A(H1N1)pdm09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(H1N1)pdm09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。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬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共同で、2009年9月からA (H1N1) pdm09薬剤耐性株サーベイランスを実施している。

2010/11シーズンからは、オセルタミビル、ザナミビル、2010年1月に国内販売が開始されたペラミビル (商品名ラピアクタ)、および、2010年10月に国内販売が開始されたラニナミビル (商品名イナビル) を加えた4種の薬剤についてサーベイランスを実施した。

B. 研究方法

2010/11シーズンのA (H1N1) pdm09分離株について、各地方衛生研究所において毎週概ね3株を目標値として、NA遺伝子の部分塩基配列の決定またはTaqMan RT-PCR法により、H275Y耐性マーカーの有無を検索し、薬剤耐性株のスクリーニングを行った。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詳細な遺伝子解析を行い、さらにNA-StarまたはNA-XTD基質を用いた化学発光法あるいはMUNANA基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC50値を算出した。また、2010/11シーズンのA (H1N1) pdm09分離株のうち、感染症サーベイランスシステム (NESID) 登録株の約5-10%をコンピュータでランダムに選択し、オセルタミ

ビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、薬剤耐性株のスクリーニングを行った。

C. 研究結果

薬剤耐性株サーベイランスは、2009/10シーズンには、37都道府県、53地衛研/保健所で実施されていたが、2010/11シーズンには、47都道府県、71地衛研/保健所に拡大した。すべての都道府県で薬剤耐性株サーベイランスが開始されたことにより、日本全域における薬剤耐性株の発生状況を迅速により正確に把握することが可能になった。

2010/11シーズンには、A (H1N1) pdm09分離株3,844株を解析し、そのうち78株がH275Y耐性マーカーをもっており、耐性株検出率は2.0%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を示すことが確認された。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。

耐性株78株のうち、薬剤の治療投与例は28例、予防投与例は14例、薬剤の未投与例は34例であった。検出された耐性株はいずれも散発例であり、地域的な広がりも確認されていない。

TaqMan RT-PCR法では、感受性株とH275Y耐性株に加えて、両者の混合株を区別して検出することができる。これまでに検出されたH275Y耐性株のうち、混合株は約15%を占めていた。混合株について薬剤感受性試験を行った結果、NA-Star基質を用いた化学発光法では、正確なIC50値を得られないことが明らかになった。そこで、

試験系を改良し、MUNANA基質を用いた蛍光法により薬剤感受性試験を試みた結果、正確なIC50値を得ることができた。したがって、感受性株とH275Y耐性株の混合株を用いる薬剤感受性試験には、MUNANA基質を用いる蛍光法が適していることが明らかになった。

D. 考察

2008/09シーズンには、解析株2,129株中、10株でH275Y耐性マーカーが検出され、耐性株検出率は0.5%であり、2009/10シーズンには、解析株5,985株中、69株でH275Y耐性マーカーが検出され、耐性株検出率は1.2%であった。2010/11シーズンには、解析株3,844株中、78株でH275Y耐性マーカーが検出され、耐性株検出率は2.0%であったことから、シーズン毎にわずかながら検出率の上昇が認められた。2010/11シーズンの検出率2.0%は、オセルタミビル耐性のAソ連型H1N1ウイルスが国内に侵入する以前の2007/08シーズンの日本国内における耐性株検出率2.6%を超えていない。しかし、約半年後の2008/09シーズンには耐性株の検出率が99.6%に達したことから、注意深く監視を続ける必要がある。

2008/09 シーズンおよび 2009/10 シーズンは、耐性株の大半がオセルタミビルあるいはペラミビルの治療投与または予防投与中に検出されていた。一方、2010/11シーズンには、耐性株の約44%が薬剤の未投与例から検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が考えられる。現時点では、耐性株はいずれも散发例であり、地域への拡大は確認されていないが、今後も引き続き注意深く監視を継続する必要がある。

感受性株と H275Y 耐性株の混合株を用いる薬剤感受性試験には、MUNANA 基質を用

いる蛍光法が適していることが明らかになったことから、2011/12 シーズンは、すべての解析株について蛍光法により薬剤感受性試験を実施することで、試験の効率と精度の上昇が期待される。

E. 結論

2010/11シーズンに日本国内で検出されたオセルタミビル/ペラミビル耐性 A (H1N1) pdm09株は総解析株中2.0%であり、シーズン毎にわずかながら検出率の増加傾向が認められた。また、薬剤の未投与例から検出される耐性株の割合は44%を占め、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆されたことから、今後も引き続き、薬剤耐性株の発生状況について、注意深く監視を続ける必要がある。薬剤感受性試験系の改良により、2011/12シーズンからは、より効率的で精度の高い薬剤感受性試験の実施が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Nakauchi, M. Ujike, M. Obuchi, E. Takashita, I. Takayama, M. Ejima, K. Oba, N. Konomi, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Kageyama and the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*, 83, 1121-1127, 2011
M. Ozawa, ST. Victor, AS. Taft, S. Yamada, C. Li, M. Hatta, SC. Das, E. Takashita, S. Kakugawa, EA. Maher, G. Neumann and Y. Kawaoka. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express

a foreign gene. *Journal of General Virology*, 92, 2879-2888, 2011

高下恵美。Pandemic (H1N1)2009ウイルスと耐性。インフルエンザ、12, 273-278, 2011

2. 学会発表

E. Takashita, M. Ejima, S. Fujisaki, N. Kim, N. Kishida, H. Xu, H. Sugawara, R. Itoh, T. Doi, M. Tashiro and T. Odagiri : Surveillance of antiviral drug-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 viruses in Japan *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions*, May 2011

小田切孝人、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、金南希、田代真人：国内外で分離された2010/11シーズンのインフルエンザ流行株について 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011年6月

江島美穂、高下恵美、藤崎誠一郎、金南季、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスおよび耐性株検出状況について 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011年6月
川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、岩田真美、豊澤隆弘、高下恵美、江島美穂、小田切孝人、田代真人：2010/2011シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性ウイルス 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011年6月

E. Takashita, M. Ejima, I. Takayama, M. Nakauchi, S. Fujisaki, N. Kim,

N. Kishida, H. Xu, H. Sugawara, R. Itoh, T. Doi, T. Kageyama, M. Tashiro and T. Odagiri : Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009

(A(H1N1)pdm0909) viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in Japan XV International Congress of Virology, September 2011

H. Xu, N. Kishida, E. Takashita, S. Fujisaki, R. Ito, T. Doi, H. Sugawara, M. Ejima, N. Kim, M. Tashiro, T. Odagiri, and the influenza virus surveillance group of Japan : Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in Japan XV International Congress of Virology, September 2011

E. Takeda, A. Sakurai, E. Takashita and J. Yasuda : Tetherin/bst-2 functions as an antiviral cellular factor against influenza virus XV International Congress of Virology, September 2011

N. Kishida, H. Xu, H. Sugawara, R. Ito, T. Doi, E. Takashita, S. Fujisaki, M. Ejima, N. Kim, R. Saito, H. Ikematsu, M. Tashiro and T. Odagiri :

Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells XV International Congress of Virology, September 2011

C. Kawakami, E. Takashita, M. Ejima, S. Fujisaki, N. Kim, S. Usuku, E. Kurata, M. Iwata, T. Toyozawa, T. Odagiri and M. Tashiro : Neuraminidase

inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan XV International Congress of Virology, September 2011 M. Nakauchi, E. Takashita, M. Tashiro, H. Nishimura and E. Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of Pandemic influenza A(H1N1)pdm0909 virus, recognized by human antibody XV International Congress of Virology, September 2011

高下恵美、本村和嗣: 2010/11シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株検出状況 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2011年10月

川上千春、七種美和子、岩田眞美、高下恵美: 横浜市におけるA型インフルエンザウイルスの薬剤耐性株サーベイランス 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2011年10月

I. Takayama, E. Takashita, M. Ejima, M. Nakauchi, S. Fujisaki, N. Kim, N. Kishida, H. Xu, H. Sugawara, R. Itoh, T. Doi, T. Kageyama, T. Odagiri and M. Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A(H1N1)pdm0909 viruses in

Japan Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, November 2011

岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、

佐藤彩、田代眞人: インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性をもとに評価した2010/11シーズンA/H3およびB型ワクチンの効果 第15回日本ワクチン学会学術集会、2011年12月

高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、今井正樹、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、佐藤彩、田代眞人、小田切孝人: 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの検出と性状解析 First Negative Strand Virus-Japan Symposium、2012年1月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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

研究分担者 佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）
研究協力者 横山勝（国立感染症研究所 同上 主任研究官）
研究協力者 本村和嗣（国立感染症研究所 同上 主任研究官）

研究要旨

インフルエンザウイルスのサーベイランスとワクチン株選定に役立つ新たな解析・情報基盤の構築を目的とする。変異がウイルス分子の構造や性質に与える影響を迅速に解析する手法として計算科学のシミュレーション技術に着目した。本年度は、本研究班で得られるインフルエンザウイルスのアミノ酸配列情報を基に、コンピュータを用いてエンベロープ蛋白質の機能構造（HA 蛋白質三量体と NA 蛋白質四量体）のモデルを構築し、変異の立体配置や構造学的インパクトを解析した。これにより、ウイルスの性質変化を支える構造要因の情報を得た。これらの解析を通じ、A 香港型と B 型の流行株、ワクチン原株、変異株について、エンベロープ蛋白質の構造情報を収集し、本体研究の推進に役立てる解析プラットフォームの構築が着実に進んだ。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは、変異により形や性質を速やかに変える。サーベイランスやワクチン株選定を科学的根拠に立脚して実施するには、ウイルス蛋白質に生じる変異のリスクについて理解を深めることが不可欠である。ただし、一般には、実験のみでウイルスの構造や性質の変化を知るには時間と労力がかかる。

計算機能力の向上や物理化学の諸原理に基づく計算科学の進展とともに、コンピュータを用いた分子モデリングやシミュレーション技術が急速に向上している。

これらの *in silico* 技術を用いれば、実験では解析しにくい問題にアプローチできる。また、解析時間の短縮や効率の向上が見込まれる。シミュレーション技術は、既に、物理化学、地学、環境科学、工学、薬学、医学など、基礎から応用開発研究の幅広い分野において、研究を支援する汎用技術となっている。しかし、病原体研究への応用は遅れている。

そこで本研究では、本体研究で得られるウイルス変異の情報を取り入れて、

ウイルス蛋白質の *in silico* 構造解析を実施する。これにより、流行株、ワクチン原株、変異株について、ウイルス蛋白質の構造情報を *in silico* 技術を用いて収集し、本体研究の推進に役立つ基盤をつくる。本年度は、エンベロープ蛋白質 (HA, NA) の機能構造 (多量体) に関わる解析を実施した。

B. 研究方法

変異蛋白質の分子モデリングは、ホモロジーモデリング法 (1,2) を用いた。ホモロジーモデリングは、Molecular Operating Environment (MOE) (3) (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) に搭載されているプログラムを用いた。MOE はカナダ CCG 社が独自に開発した SVL (Scientific Vector Language) を搭載する統合計算化学システムで、分子の構造・機能を統合的に解析するプラットフォームを提供する(3)。

ホモロジーモデリング法は、遺伝子配列から得られるアミノ酸配列情報と、機能が類似する蛋白質の立体構造情報とを組み合わせ、未報告の蛋白質分子モデルを構築する方法である (1,2)。鋳型となる蛋白質とのホモロジーが 90% 程度あれば、X 線結晶構造解析と同程度の精度 ($\sim 2\text{\AA}$) をもつモデルを構築できる (1,2)。すなわち、ウイルス変異株や亜株の蛋白質について、鋳型となる構造があれば、高精度の分子モデルが得られる。我々は、既にホモロジーモデリング法について、数多くの応用実績がある(4-27)。しかし、インフルエンザウイルスの蛋白質については、まだ実績が無い。

References

(1) Baker D, Sali A., Protein structure prediction

and structural genomics. *Science* 294: 93-96, 2001.

(2) Sanchez R, et al., Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol* 7 Suppl: 986-990, 2000.

(3) MOE. <http://www.chemcomp.com/>

(4) Kinomoto M, et al. Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol.* 79:5996-6004, 2005.

(5) Kinomoto M, et al. HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* 41:243-51, 2005.

(6) Chen R, et al. HIV Mutagenesis During Antiviral Therapy: Impact of Drug Resistant Reverse Transcriptase, Nucleoside And Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors On Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutant Frequencies. *J. Virol.* 79:12045-12057, 2005.

(7) Oka T, et al. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J. Virol.* 81:6798-806, 2007.

(8) Song H, et al. A single amino acid of Human immunodeficiency virus type 2 capsid determines susceptibility to cynomolgus monkey and human TRIM5 α restriction. *J. Virol.* 81:7280-5, 2007.

(9) Naganawa S, et al. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. *PLoS One.* 3(9):e3206, 2008.

(10) Motomura K, et al. Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in 2006/2007 Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genome-wide Tracing of Evolutionary History.