

- J. Virol.* 82:11247-11262, 2008.
- (11) Shirakawa K, et al. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1184-91, 2008.
- (12) Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. *PLoS One.* 5:e8867, 2010.
- (13) Gatanaga H, et al. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not etravirine. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1596-602, 2010.
- (14) Gatanaga H, et al. Impact of human leukocyte antigen-B\*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS.* 24:F15-22, 2010.
- (15) Onyango CO, et al. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. *Vaccine.* 28 Suppl 2:B60-7, 2010.
- (16) Motomura K, et al. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.* 84(16):8085-97, 2010.
- (17) Kono K, et al. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 $\alpha$ -mediated restriction. *Retrovirology*, 7:72,2010.
- (18) Inagaki N, et al: A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology*, 7:90,2010.
- (19) Ode H, Yokoyama M, Kanda T, Sato HH. (倫理面への配慮) Identification of folding preferences of cleavage 該当する事項は無い。  
junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of
- cleavability. *J. Mol. Model.*, 17(2):391-9, 2011.
- (20) Kobayashi T, et al. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-4, 2011.
- (21) Shibata J, et al. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 90(1):33-41, 2011.
- (22) Yoshii H, et al. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One.* 6(4):e19352, 2011.
- (23) Miyamoto T, et al. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . *PLoS One* 6(7):e22779, 2011.
- (24) Nishitsuji H, et al. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.*585(21):3372-7, 2011.
- (25) Chutiwitoonchai N, et al. The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS One.* 6(11):e27696, 2011.
- (26) Iijima S, et al. A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *J. Virol. in press.*
- (27) Sakuragi J, et al. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nuc.Acids.Res. in press.*

### C. 研究結果

(1) 富山県で流行した A 香港型 (H3N2) の HA 蛋白質三量体の構造解析: HA 蛋白質は、ウイルス粒子上で三量体で機能する。A(H1N1) HA 蛋白質三量体の結晶構造 (PDB code: 1RVT) を鋳型とし、ホモロジーモデリング法により、2009-2011 年に富山県で流行した A 香港型の HA 蛋白質の三量体分子モデルを作った。近年の流行株に特徴的なアミノ酸変異 (A197T) は、感染受容体への結合に直接関わる 190-helix に位置することがわかった。すなわち、近年の A 香港型流行株は、受容体特異性や親和性が変化している可能性がある。この可能性は、A197T 変異をもつ 2009-2011 年流行株の HA 価が低い事実と一貫性がある。

(2) 2011 年 B 型薬剤耐性分離株の NA 蛋白質四量体の構造解析: 藤崎、小田切らは、2011 年の B 型ヴィクトリア系統の分離株の一部に、薬剤耐性 (タミフル、ペラミビル、ザナミビル耐性) とリンクするアミノ酸変異 (E105K) を見出した。近年日本で流行する B 型ヴィクトリア系統は、NA 蛋白質のバックボーンの経年変化により、既知の耐性変異をもたなくとも耐性を獲得する可能性がある。

そこで E105K 変異をもつ NA 分子の構造モデルを構築し、変異の位置と構造への影響を調べた。NA 蛋白質は、ウイルス粒子上で四量体で機能する。B 型山形系統の NA 蛋白質四量体の結晶構造 (B/Perth/211/2001, PDB code: 3K37) を鋳型とし、ホモロジーモデリング法により、B 型の薬剤感受性株と薬剤耐性株の NA 蛋白質四量体の分子モデルを作った (図 1)。E105K 変異は、NA 四量体において、単量体間の境界面に位置することがわかった。この変異は、境界面の荷

電環境の変化を介して、四量体構造の安定性の変化を惹起しうる。また、隣接する W438 との相互作用の変化を介して、間接的に抗ウイルス薬の結合部位の一部 (R116) の立体配置に影響を与えうる位置にある。

ただし、ホモロジーモデルでは、薬剤結合部位の大きな変化は認められなかった。一般に、リガンドと蛋白質の結合には、結合ポケットのアミノ酸側鎖の“適切な揺らぎ”が重要となる。ホモロジーモデルは静止構造で、蛋白質の水溶液中での動的性質は解析できない。E105K 変異による薬剤耐性の分子機構の詳細を理解するには、分子動力学法等を用いて薬剤結合部位近傍の揺らぎの変化を詳細に調べる必要があると考えられる。本研究班における分子動力学法の応用基盤の構築は、今後の課題とする。

NA 四量体の境界面に生じる変異による耐性発現は、まだ報告が無い。サーベイランスにとって貴重な変異情報となりうる。近年の B 型薬剤感受性株をバックボーンにして、E105K 変異を導入すると耐性が発現するかを確認することが重要となる。耐性変異と定義できる時は、次世代シーケンサーを用いて、感染者検体中に E105K 変異をもつウイルスが混在する頻度を調べることも重要となろう。

### D. 考察

初年度は、A/X-31 (H3N2) および B/Hong Kong/8/1973 を鋳型として、A 香港型と B 型の 2010/11 シーズンの日本のワクチン原株 (A/Victoria/210/2009, B/Brisbane/60/2008) の HA 蛋白質単量体の分子モデルをつくった。さらに本年度は、富山県で流行した A 香港型 (H3N2) の HA 蛋白質三量体、並びに 2011 年に流行した B 型ヴィクトリ

A系統のNA蛋白質四量体の分子モデルをつくった。いずれも高い相同性を持つ蛋白質の構造を鋳型として用いており、結晶構造とのずれは $\sim 2 \text{ \AA}$ 程度であることが期待される(1, 2)。

過去2年の研究を通じ、インフルエンザウイルスA香港型とB型の流行株、およびワクチン原株のエンベロープ蛋白質の分子モデルが得られた。さらに、これらのモデルを用いて、流行株やワクチン原株の特徴的な変異の立体配置や性質を解析した。これにより、ウイルスの性質変化(抗原性、HA活性、安定性、薬剤感受性など)を司る変異や構造要因の情報が蓄積した。以上の過去2年の研究を通じ、流行株やワクチン原株エンベロープ蛋白質の構造学的情報を提供するための*in silico*解析基盤の構築が着実に進んだ。

## E. 結論

本研究班で得られるインフルエンザウイルスの配列情報を基に、コンピュータを用いてHAとNA蛋白質の構造解析を実施した。これにより、A香港型とB型のエンベロープ蛋白質の構造と変異の影響に関する情報を迅速に提供する基盤をつくった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Obuchi M, Yokoyama M, Horimoto E, Obara M, Iwai M, Sato H, Sata T, Takizawa T. Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009-2011 influenza seasons. *Jpn*

*J Infect Dis*.64:448-50, 2011.

### 2. 学会発表

Sato H, Motomura K, Ode H, Yokoyama M. 「分子認識・ネットワーク解析の新たなキーワードとしての分子共進化」日本蛋白質科学会 ワークショップ 6月7-9日、2011年、大阪。

佐藤裕徳. 「病原性ウイルス研究と計算科学」MOEフォーラム 7月13日、2011年、東京。

小淵正次、堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、滝澤剛則、横山勝、佐藤裕徳、佐多徹太郎. 2010/11シーズンに急増した低HA価のA(H1N1)2009ウイルス分離株について. 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2日(木) - 4日(土)、2011年、富山

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、田代真人、小田切孝人: 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. 12月10-11、2011年、東京。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

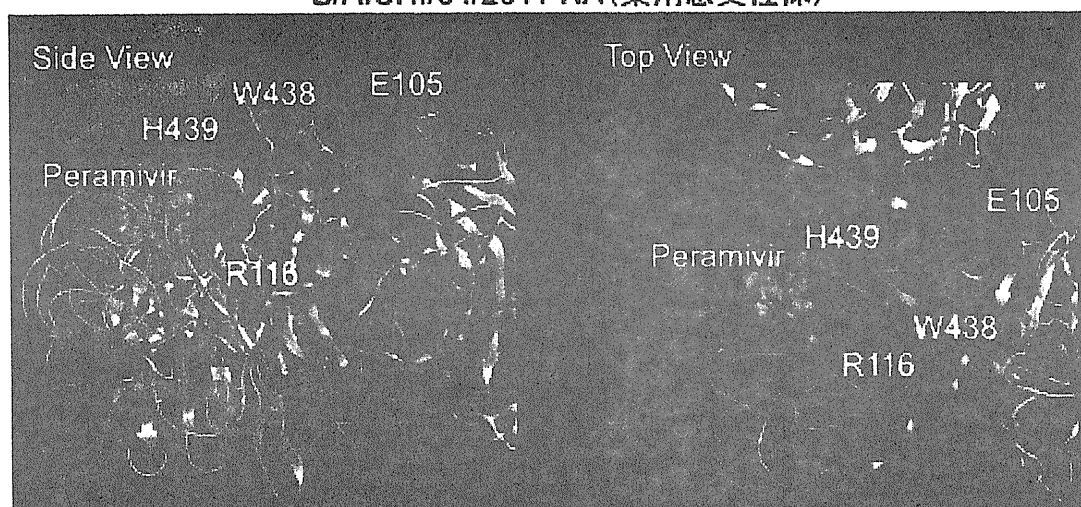
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### B/AICHI/64/2011-NA(薬剤感受性株)



### B/KOCHI/61/2011-NA(薬剤耐性株)

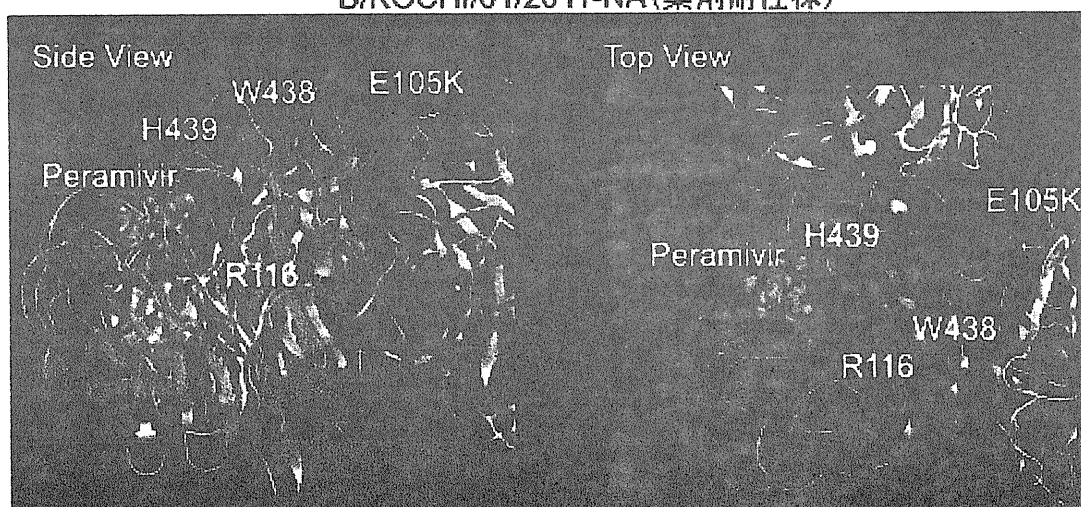


図1. 2011年B型薬剤耐性分離株のNA蛋白質四量体の構造解析

シアン：ペラミビル、青：塩基性アミノ酸、赤：酸性アミノ酸、黄緑：芳香族アミノ酸

2011年B型Victoria系統の薬剤感受性株（B/AICHI/64/2011株）と多剤耐性株（B/KOCHI/61/2011株）のNAアミノ酸配列を基に、ホモロジーモデリング法により、NA四量体の立体構造モデルを構築した。（鋳型：B型山形系統株B/Perth/211/2001のNA四量体の結晶構造、PDB code:3K37）。耐性株に特徴的な変異（E105K）はNA四量体の境界面に生じていた。この変異は、W438位置の変化を誘起しうる位置にあった。また、E105Kは、近傍のW438との相互作用の変化を介して、H439の位置の変化を誘起しうる位置にあった。さらにH439は、R116の配置の変化を誘起しうる位置にあった。R116は、ペラミビル結合に直接関与していた（水素結合）。これらの結果から、E105Kは、W438/H439/H439の変化を介して、間接的にペラミビル結合親和性に影響しうることがわかった。NA四量体の境界面に生じる変異による耐性発現は、まだ報告が無い。近年日本で流行するB型Victoria系統は、既知の耐性変異を持たなくとも、薬剤耐性を獲得するリスクがあることがわかった。

## 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センター・次長

### 研究要旨

2010/2011 シーズン後半の分離株、2011/2012 シーズン初期の分離株、および一部の参照株について、重要分節の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型においても、2011 年前半から後半にかけて、NA 分節に特定のアミノ酸置換を持つ株の顕著な増加が見られた。M 分節はいずれの型においても特定の変異の増加傾向は認められなかった。薬剤耐性変異の動向に大きな変化はなかったものの、A(H1N1)pdm09 では NA 分節に H275Y 変異を持つ株が引き続き認められた。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)に加えて、B 型でも全ゲノム解析プロトコルを確立した（年度末見込み）。

### A. 研究目的

シーズンを通して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。全ゲノム解析のためのプロトコルの整備を進めるとともに、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インフルエンザウイルスの 5-10%を目処に、重要な遺伝子分節の全塩基配列を決定する。今年度は、前年度から引き続き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）分節の全塩基配列を決定したのに加え、HA 分節の HA2 領域の塩基配列決定を行って感染研インフルエンザセンターに提供した。別途感染研インフルエンザセンターにおいて配列決定を行っている HA1 領域と合わせ、HA 分節についても全塩基配列を解析する体制を整えた。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 によるアセンブル、の順序で行った。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。すでに全ゲノム解析の  
 プロトコルを確立している A(H1N1)pdm09  
 および A(H3N2)に加え、今年度は B 型ウイ  
 ルスの全ゲノム解析プロトコルの作成を  
 進めている。

(倫理面への配慮)

患者の個人情報等、倫理面での配慮が  
 必要な情報は提供を受けていない。また、  
 データの公表（データベースへの登録）  
 はすべて感染研インフルエンザセンター  
 を通して行った。

## C. 研究結果

### 1. 概要

2011 年 6 月から 2012 年 1 月までの間に、  
 8 回に分けて、計 308 件の RNA サンプルを  
 受領し、A 型については NA、M、HA2 の各  
 分節を、B 型については NA、HA2 の各分節  
 を解析した。昨年度分と合わせたこれま  
 での解析実績は次表の通りである（重複  
 分を除く）。

シーズン	型・亜型	受入数	成功数
2009/2010	A (H1N1) pdm	73	71
	A (H3N2)	38	37
	B	105	101 <sup>a)</sup>
2010/2011	A (H1N1) pdm	75	73
	A (H3N2)	99	99
	B	130	126 <sup>a)</sup>
2011/2012	A (H1N1) pdm	1	1
	A (H3N2)	56	55
	B	32	30 <sup>a)</sup>
合計		609	593

a) B 型の失敗例はいずれも NA セグメントにおけるもの。  
 プライマー配列への適合率が低下している傾向が見  
 られる。

### 2. A(H1N1)pdm09 の変異解析

#### NA 分節

NA 分節のアミノ酸配列をもとに作成し

た最尤系統樹を図 1 に示す。比較のため、  
 2009 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の株、  
 および昨年度に解析した本格流行期以降  
 の株のデータを含めた。2009 年秋の本格  
 流行期以降に分離された株は 1 例  
 (A/Taiwan/23/1010) を除いてすべて  
 V106I および N248D の変異を持つもので  
 あったが、今年度に解析した株もすべて  
 これらの変異を持つグループに属してい  
 た。また、2011 年中に分離された株では、  
 52 株中の 45 株が、上記の 2 つの変異に加  
 えて、N44S、V241I、N369K の変異を持っ  
 ており、NA 分節において変異の蓄積が進  
 んでいることが示唆された。

図 1 において、今年度に解析対象とした  
 60 株のうち 30 株が H275Y のオセルタミビ  
 ル耐性変異を持っているが、これは地検  
 および感染研インフルエンザセンターに  
 おいて、耐性株の遺伝子解析を別途集中  
 的に行ったためである（図 1 にはこれら  
 のうち NA 分節の全長解析が行われた株の  
 データも含まれている）。2010/2011 シー  
 ズン全体としては、H275Y 変異の検出率は  
 2%であり、わずかながら増加傾向が認め  
 られると報告されている(1)。なおこれら  
 の変異株のほとんどが、上記の N44S、  
 V241I、N369K 変異を含むグループに属し  
 ていた。今後とも、耐性変異を含めた変  
 異の推移を監視する必要があると思われ  
 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、初期分離株からの際だっ  
 た変異の蓄積は認められなかった。なお、  
 これまでと同様、解析した株のすべてが  
 M2 に S31N のアマンタジン耐性変異を持  
 っており、A/(H1N1)pdm09 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。昨年度の解析では M2 のイ

オンチャンネル付近の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株認められたが、今年度に解析を行った株にはこの変異を持つものはなかった。

### 3. A(H3N2)の変異解析

#### NA分節

NA分節のアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹を図2に示す。比較のため昨年度の解析株のデータを含めた。2010/2011シーズンから2011/2012シーズン初期にかけて分離された株は、2011/2012シーズンのワクチン株であるA/Victoria/210/2009を基準として、D127N、I307M、L338F、N342Dのアミノ酸置換を持つグループと、S367N、K369T、I464Lのアミノ酸置換を持つグループに大別された。2011年の7月以降に分離された株53株はすべて前者のグループに属し、上記の変異に加えてL81Pのアミノ酸置換を持っていた。また、このうち48株は、さらにN402Dのアミノ酸置換を持つものであった。ワクチン株からのシフトが次第に進んでいるものと思われる。

昨年度の解析株を含め、これまでに解析した2009/2010シーズン以降の株には、E119V、R292Kの薬剤耐性変異を持つものはなかった。

#### M分節

昨年度に引き続き、M1には変異の蓄積はほとんど見られなかった。一方M2については、昨年度は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。今年度の解析株でも同様の変異が少数ながら認められたが、増加する傾向は認められなかった。なお、これまでと同様、解析したすべての株がM2にS31Nのアマンタジン耐性変異を持っていた。

### 4. B型の変異解析

NA分節のアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹を図3に示す。比較のため昨年度の解析株のデータを含めた。昨年度は国内分離株の大半がVictoria系統に属していたが、今年度に解析した株でも同様にVictoria系統に属するものが多くを占めた。Victoria系統の中では、特定のグループに分離株が集中する傾向はみられなかった。一方、Yamagata系統の中では、昨年度の解析では見られなかったA/Florida/4/2006(2008/2009シーズンワクチン株)に類似の株が台湾を中心に新たに分離されている(国内では2011年9月末以降に分離された4例)。中国の1株でI221Tの薬剤耐性変異が見られたが、2011年7月以降の分離株の中にはこの変異を持つものはなかった。

### 5. 全ゲノム解析プロトコルの整備

A(H1N1)pdm09については、2009年のパンデミック発生時に解析プロトコルを確立済みであるが、今年度はA/Chiba/17/2010およびA/Shiga/28/2011の2株について全ゲノム解析を行い、プロトコルの有効性を確認した。

A(H3N2)については、昨年度末に解析プロトコルを作成し、8株についてその有効性を確認した(昨年度の分担研究報告書には未記載)。

B型については、今年度内のプロトコル完成を目標に、プライマー設計等の作業に着手した。

### D. 考察

NA分節の解析において、A(H1N1)pdm09では2011年1月以降の分離株で、またA(H3N2)では2011年7月以降の分離株で、昨シーズンの流行株に比べて新たなアミ

ノ酸置換が加わったグループの顕著な増加が見られた。また B 型の Yamagata 系統では、昨年度の解析では見られなかった A/Florida/4/2006 に類似の株の増加が認められた。いずれに型についても引き続き流行株の遷移を注視する必要があると思われる。A(H1N1)pdm09 では NA 分節に H275Y のアミノ酸置換を持つ薬剤耐性株が散発的に分離されており、他の変異の蓄積と合わせて、引き続き監視が必要と思われる。

## E. 結論

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型においても、2011 年前半から後半にかけて、NA 分節に特定のアミノ酸置換を持つ株の顕著な増加が見られた。M 分節はいずれの型においても特定の変異の増加傾向は認められなかった。薬剤耐性変異の動向に大きな変化はなかったものの、A(H1N1)pdm09 では NA 分節に H275Y 変異を持つ株が引き続き認められた。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)に加えて、B 型でも全ゲノム解析プロトコルを確立した(年度末見込み)。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[研究課題に関連するもの]

- 1 岸田典子, 高下恵美, 藤崎誠一郎, 徐紅, 伊東玲子, 土井輝子, 江島美穂, 金南希, 菅原裕美, 佐藤彩, 今井正樹, 小田切孝人, 田代真人, 本村和嗣, 横山勝, 終元巖, 佐藤裕徳, 小口晃央, 山崎秀司, 藤田信之, 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. 2010/11 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報月報, 32, 317-323, 2011.

[その他]

- 1 Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K.

and Ishihama, A.: Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One*, 6, e20081, 2011.

- 2 Sakai, S., Takaki, Y., Shimamura, S., Sekine, M., Tajima, T., Kosugi, H., Ichikawa, N., Tasumi, E., Hiraki, A.T., Shimizu, A., Kato, Y., Nishiko, R., Mori, K., Fujita, N., Imachi, H. and Takai, K.: Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order Methanocellales. *PLoS One*, 6, e22898, 2011.
- 3 Yamamura, H., Hanawa, K., Kusunoki, M., Nakamura, K., Nakagawa, Y., Ishida, Y., Hamada, M., Otoguro, M., Tamura, T., Fujita, N. and Hayakawa, M.: Variation and predicted structure of the flagellin gene in *Actinoplanes* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 324, 21-27, 2011.
- 4 Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D., Akada, R., Ando, Y., Harashima, S., Inoue, T., Inoue, Y., Kajiwara, S., Kitamoto, K., Kitamoto, N., Kobayashi, O., Kuhara, S., Masubuchi, T., Mizoguchi, H., Nakao, Y., Nakazato, A., Namise, M., Oba, T., Ogata, T., Ohta, A., Sato, M., Shibasaki, S., Takatsume, Y., Tanimoto, S., Tsuboi, H., Nishimura, A., Yoda, K., Ishikawa, T., Iwashita, K., Fujita, N. and Shimoi, H.: Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* kyokai no. 7. *DNA Res.*, in press, 2011. (doi: 10.1093/dnares/dsr029)
- 5 Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, H., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K., Matsushita, K., Fujita, N. and Shirai, M.: Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. *J. Bacteriol.*, 193, 6997-6998, 2011.
- 6 Nagata, Y., Natsui, S., Endo, R., Ohtsubo, Y., Ichikawa, N., Ankaï, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N. and Tsuda, M.: Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal  $\square$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb. Technol.*, 49, 499-508 2011.
- 7 Masai, E., Kamimura, N., Kasai, D.,



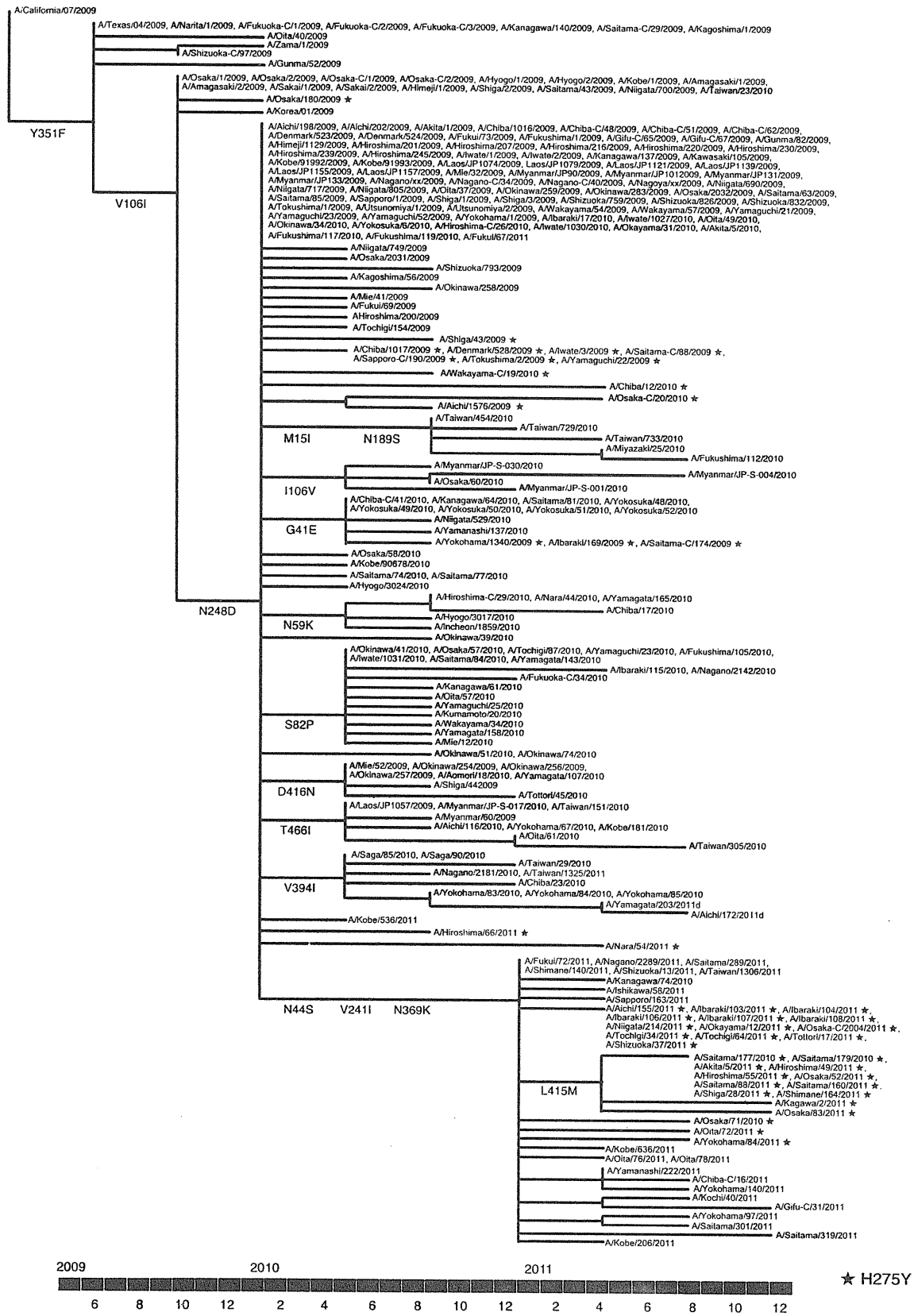
Oguchi, A., Ankai, A., Fukui, S., Takahashi, M., Yashiro, I., Sasaki, H., Harada, T., Nakamura, S., Katano, Y., Narita-Yamada, S., Nakazawa, H., Hara, H., Katayama, Y., Fukuda, M., Yamazaki, S. and Fujita, N.: Complete genome sequence of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and monoaryls. *J.*

*Bacteriol.*, 194, 534-535, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

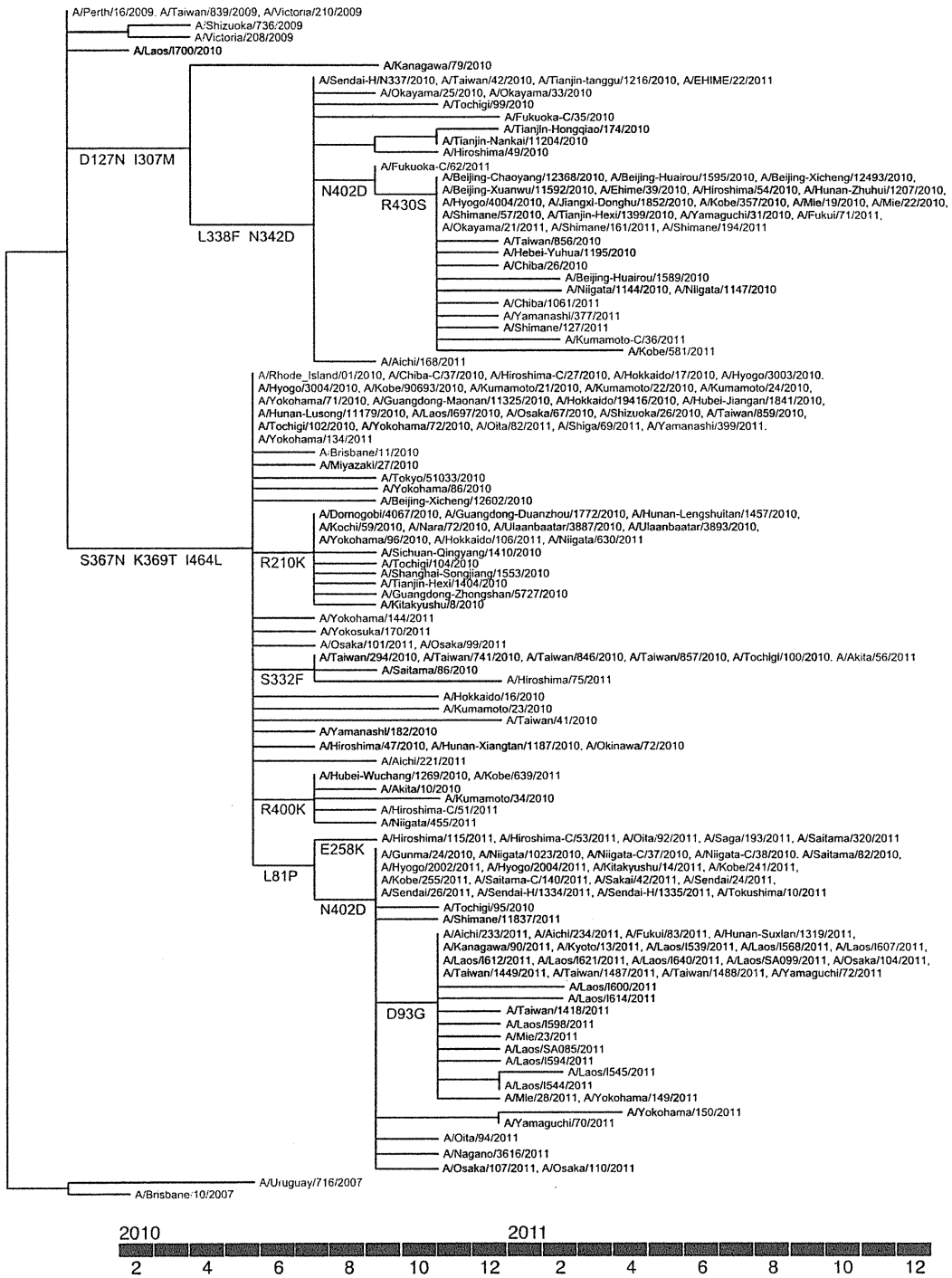
NA protein of A/H1pdm09 viruses (ML tree)

Fig. 1



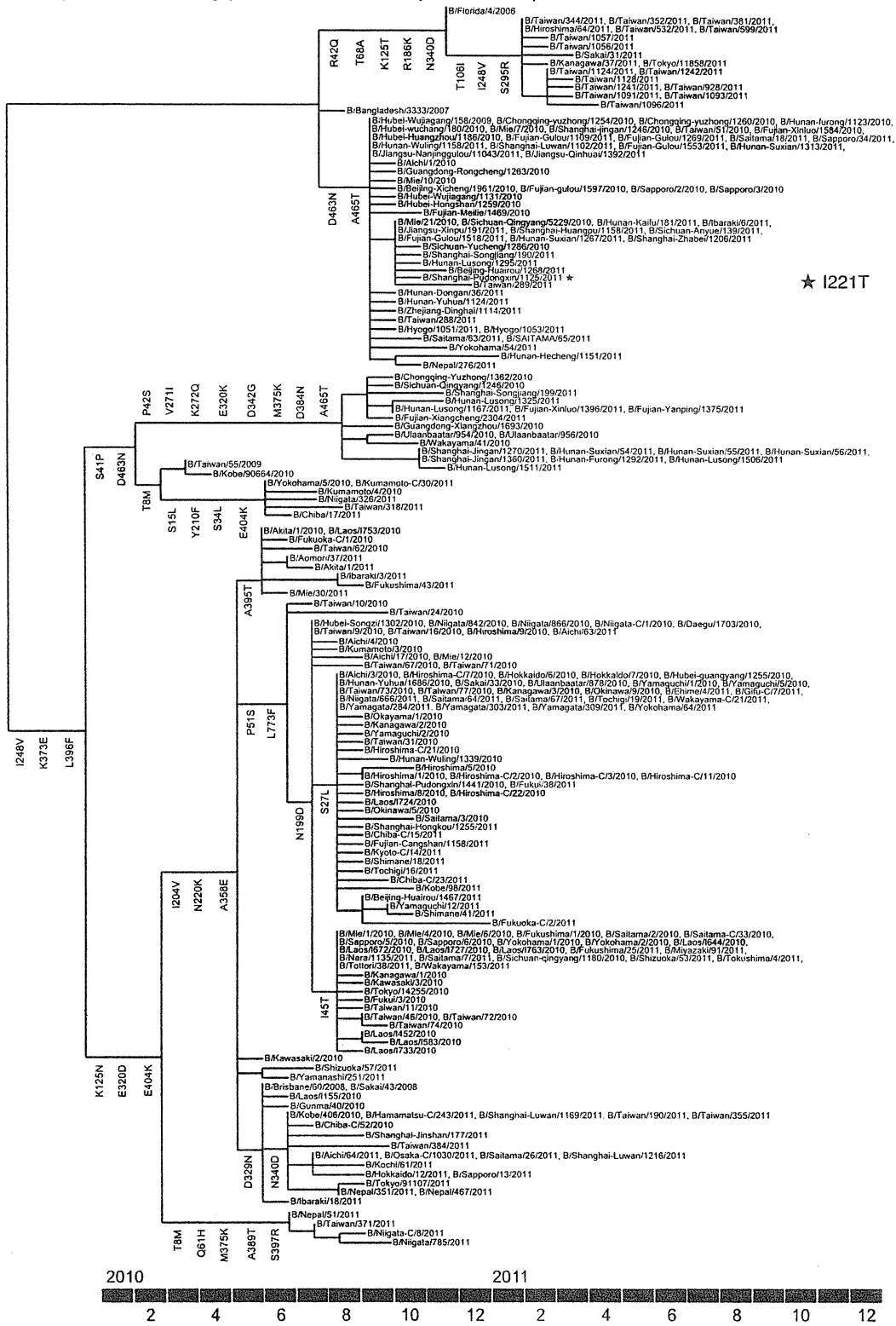
NA protein of A/H3 viruses (ML tree)

Fig. 2



# NA protein of type B viruses (ML tree)

Fig. 3



## 「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・教授

研究協力者 菖蒲川由郷（新潟大学大学院医歯学系・助教）、鈴木宏（新潟青陵大学・看護福祉心理学科・教授）、樋熊紀男（女池南風苑・施設長）、高橋キイ子（女池南風苑・看護師長）、布施克也（新潟県立小出病院・院長）

### 研究要旨

パンデミック終息以来、最初のシーズンとなった 2010-2011 シーズンの三価インフルエンザワクチン接種前後の成人・高齢者の A(H1N1)pdm 抗原、季節性 A(H3N2) 抗原、B 抗原、さらにはワクチンに含まれていない季節性 A(H1N1) 抗原に対する血清抗体価の調査を行った。

医療従事者 532 名（年齢 20-79 才）と、高齢入所者 47 名（63-100 才）のワクチン接種前後の HA 抗体価の測定を行った。

A(H1N1)pdm に対する抗体は、成人・高齢者とも接種前 30%未満と低かったものの、ワクチン接種による抗体価上昇が認められたことから、今後も、A(H1N1)pdm を含む三価ワクチン接種は必要と考えられた。また、三価ワクチンに含まれていない季節性 A(H1N1) 抗原に対する抗体価も少なからず接種後に上昇し、新型ワクチンが季節性 A(H1N1) の抗体価に影響する可能性が示唆された。特に季節性 A(H1N1) に対する記憶免疫が存在すると仮定される高齢者では成人と比較し新型ワクチンの接種による抗体価上昇幅が大きく、ブースター効果と考えられた。他の A(H3N2)、B 型では接種後でおおむね 70%に達する有効抗体保有率を達成していたが、高齢者ではやや反応が悪く、特に A(H3N2) では接種後も 38.3%と低い保有率にとどまった。

### A. 研究目的

2009-2010 パンデミックシーズンに A(H1N1)pdm09 ウイルスが世界的に拡散し流行した。本邦でも 2009 年夏以降全国的な流行となり、新型インフルエンザワクチンも医療従事者から優先に接種が始まり、小児、基礎疾患をもつ高齢者など、

順次接種がなされた。しかし、流行と接種のタイミングがずれ、新型ワクチンの効果への評価は難しくなった。その後、2010 年 8 月にはパンデミックの終息宣言がなされ、パンデミックを引き起こしたウイルスは季節性 A(H1N1)pdm09 として扱われることとなった。従来の A ソ連型・

季節性 A(H1N1)はワクチンから外され、三価ワクチンは A(H1N1)pdm、A(H3N2)、B の三価で構成された。

本調査では、パンデミック終息以来、最初のシーズンとなった 2010-2011 シーズンのワクチン接種前後の成人、高齢者の血清抗体価を測定し評価することで、三価ワクチンが抗体価に与える影響・ワクチン接種の有用性を検証した。なお、三価ワクチンには含まれていない季節性 A(H1N1) 抗原に対する抗体価も評価することで、新型ワクチンが季節性 A(H1N1) 抗体価に与える影響についても検討した。

## 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 10-11 月にデンカ生研社製の 2010-11 年シーズンインフルエンザワクチン（三価）を接種し、その前後で血清採血を行い、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について聴取した。ワクチン接種後採血はワクチン接種後 4 週間程度経過後に行った。

血清は検査まで $-20^{\circ}\text{C}$ にて新潟大学で保管し、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(A/California/7/2009)、季節性 H3N2 抗原(A/Victoria/210/2009)、B 抗原(B/Brisbane/60/2008)、さらには三価ワクチンに含まれていないが季節性 H1N1 抗原(A/Brisbane/59/2007)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。

抗体価の解析は高齢者施設の医療従事者と一般病院の医療従事者を合わせて“医療従事者群”とし、高齢者施設の入所者を“入所者群”として、大きく 2 群

に分けて抗体価の上昇について評価した。さらに、医療従事者では前年度のワクチン接種歴により、①季節性と新型両方接種、②新型のみ接種、③季節性のみ接種、④いずれも未接種の 4 群に区分し評価した。抗体価の評価にはワクチン接種前後の有意抗体保有率(40 倍以上 HI 抗体保有率)、および幾何平均抗体価(GMT)を用いた。接種後の抗体価の上昇幅の評価は抗体有意上昇率(ワクチン接種前後で 4 倍以上の抗体価上昇があった人の割合)を用いた。

## (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 532 件、高齢者施設の入所者の血清は 47 件採取された。医療従事者の平均年齢は 42.1 才、入所者の平均年齢は 86.3 才であった(表 1)。医療従事者の年齢幅は 20 才から 79 才、入所者は 63 才から 100 才であった。前年度(2009 年)のワクチン接種歴により医療従事者は、季節性と新型両方接種(66.0%)、新型のみ接種(4.1%)、季節性のみ接種(22.2%)、いずれも未接種(6.8%)の 4 群に区分された。入所者に新型接種者はおらず、季節性ワクチンの接種は大半の対象者に行われていたため、区分せずに解析した。

接種前の A(H1N1)pdm に対する 40 倍以上の HI 抗体保有率は医療従事者で 26.7%、高齢者で 25.5%と大差はなく、いずれも低い値であった(表 2)。医療従事者を 4 群に分けた比較では前年度に新型と季節性

両方接種群で 31.6%、新型のみ接種群で 31.8%であったのに対し、季節性のみ接種群で 17.8%、いずれも未接種群で 2.8%と明らかに前年度に新型ワクチン未接種群で、今回のワクチン接種前の抗体価は低かった。接種後の反応を、応答率で評価すると、医療従事者全体では 34.8%であったのに対し、入所者では 25.5%と低かった（統計学的には有意な差ではなかった）。医療従事者の 4 群では応答率に明らかな差異があり、接種前に抗体価の保有率が低かった前年度季節性ワクチンのみ接種群、前年度いずれも未接種群でそれぞれ応答率 53.4%、80.6%と高い値となった。これらに対して前年度新型のみ接種群では応答率 27.3%、両方接種群では 24.2%と低かった。

次に、今回、接種した三価ワクチンに含まれていない季節性の A(H1N1)に対する抗体価の測定も行ったので報告する。接種前の有意抗体保有率は医療従事者で 66.0%、入所者で 36.2%とひらきがあった（ $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  二乗検定）。医療従事者を前年度のワクチン接種により 4 群に分けた比較では、前年度未接種者で低い保有率（38.9%）であった他は、前年度新型のみ接種群 72.7%、前年度季節性のみ接種群 66.9%、前年度両方接種群 68.4%と比較的高い保有率であった。ワクチン接種後の反応は医療従事者では応答率 3.4%であった一方で、入所者では 17.0%と有意に入所者で高い応答率であった（ $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  二乗検定）。医療従事者を 4 群に分けた比較では応答率 2-8%程度といずれも低い変化幅であった。

A (H3N2)に対する抗体価は、接種前では医療従事者全体で 51.9%、入所者で 14.9%と有意に医療従事者で高い保有率であった（ $p < 0.001$ ,  $\chi^2$  二乗検定）。医療従事者を前年度のワクチン接種により区

分した 4 群での比較では新型のみ接種 50.0%、季節性のみ接種 50.8%、両方接種 53.3%と比較して、未接種では 38.9%と接種前の抗体価保有率は低い傾向にあった。接種後の反応を応答率で見ると、医療従事者で 38.9%、入所者で 31.9%と大差なかった。しかし、医療従事者を 4 群に分けた比較では、前年度に季節性のワクチンを接種していなかった新型のみ接種群、両方未接種群で応答率 40.9%、58.3%と、未接種群で反応が良かった。

最後に B 型インフルエンザに対する抗体価保有率は、接種前では医療従事者全体で 48.1%、入所者では 42.6%と大差なく、医療従事者を前年度ワクチン接種歴により区分した 4 群での比較では新型のみ接種 54.5%、季節性のみ接種 45.8%、両方接種 50.1%に対し、いずれも未接種で 33.3%と低い傾向であった。接種後の反応は医療従事者全体では応答率 20.1%に対し入所者では 10.6%と差があったがいずれも低い値であった。医療従事者の 4 群では大きな差があり、未接種群で応答率 55.6%と高く、新型のみ接種群、季節性のみ接種群、両方接種群ではそれぞれ 22.7%、22.0%、15.4%と低い値であった。

#### D. 考察

高齢者施設と一般病院の医療従事者（成人）532 人と高齢者施設の入所者 47 人（高齢者）について、2010-2011 シーズンのインフルエンザワクチン接種前後の A(H1N1)pdm、季節性 A(H1N1)、A(H3N2)、B に対する血清抗体価をそれぞれ測定し評価した。

A(H1N1)pdm に対する 40 倍以上 HI 抗体価保有率は接種前で成人と高齢者で 25-27%と低めであった。特に成人では前年度に半数以上が新型ワクチンを接種しており、前年度ワクチン接種 1 ヶ月後で

有意抗体保有率 7 割程度であった（前年度調査の結果より）にも関わらず、1 年経過すると、前年度新型ワクチン接種群でも 30%程度に低下しており、ワクチン接種効果が 1 年後に減衰していたことが明らかとなった。接種後の反応は成人で有意抗体保有率 59.0%にとどまり、高齢者でも 46.8%と比較的低い値であり、いずれも国際的なワクチン基準（接種後 40 倍以上の HI 抗体価保有率が成人で 70%以上・65 歳以上の高齢者で 60%以上）を満たさなかった。

今回の接種ワクチンには含まれていない季節性 A(H1N1)に対する抗体価についての検討では、接種前において、成人のうち前年度新型のみ接種、季節性のみ接種、両方接種の各群では 7 割前後の有意抗体保有率となっており、前年度新型しか接種していない成人でも接種前の保有率 7 割以上となっていることから、新型ワクチンが季節性 A(H1N1)に対する抗体誘導を惹起した可能性があるが、特に新型のみ接種群はケース数が十分ではなく、評価は確実とはいえない。高齢者では 36.2%と接種前の抗体保有率が低かったところが、接種後は 51.1%に上昇し、応答率も 17.0%と、他の成人群と比べて明らかに高いことから、過去のスペイン風邪から続いた季節性 A(H1N1)の記憶免疫が三価ワクチンに含まれる新型 A(H1N1)pdm 抗原による cross reaction としてブースターがかかった可能性がある。一方で、成人でも少しずつではあるが接種前後で季節性 A(H1N1)に対する抗体価が上昇していることから、A(H1N1)pdm ワクチンが A(H1N1)に対する抗体誘導を惹起させた可能性があるが、詳細は不明である。

A(H3N2)に対する有意抗体価保有率は成人で接種後に 70%以上と十分な効果を示した。一方で高齢者では接種後 38.3%

と不十分な効果であったことが示された。B型に対しては成人で接種後 67.5%とほぼ有効なワクチンによる防御の可能性が示され、高齢者でもやや反応が鈍いものの、接種後 59.6%とワクチン効果が認められた。

## E. 結論

A(H1N1)pdm に対する抗体は 1 シーズン目を経てなお接種前 30%未満と低く、ワクチン接種後、抗体価の上昇が認められたことから、今後もワクチン接種は必要であると考えられた。また、2011-2012 シーズンのワクチン接種前血清抗体価の検討が必要と考えられる。一方で、本調査の結果から、新型ワクチンの接種により季節性 A(H1N1)に対する防御が有効となる可能性が示された。特に季節性 A(H1N1)に対する記憶免疫が存在すると仮定される高齢者では新型ワクチン接種によるブースター効果と考えられる抗体価上昇が認められた。三価の季節性ワクチンのコンポーネントである A(H3N2)、B 型については接種後におおむね 70%に達する有効抗体保有率を達成していたが、高齢者ではやや反応が悪く、特に A(H3N2)では接種後も 38.3%と低い保有率にとどまった。

H1N1pdm09 によるパンデミックの後の最初のシーズンを迎えた 2010-2011 シーズンにおける、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。前年度 H1N1pdm09 ワクチンを接種した者でも 1 年後には抗体価が低くなっていたが、ワクチン接種により抗体価の上昇が認められたことから、今後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
Number		532	47
Age	Average	42.1±12.4	86.3
	Min-max	20-79	63-100
Vaccination	H1N1 pdm only	22	
in 2010	(%)	4.2	
	Seasonal only	118	
	(%)	22.4	
	Seasonal and H1N1 pdm	351	
	(%)	66.6	
	None	36	
	(%)	6.8	

表 2. HI antibody against influenza virus A(H1N1) pdm, seasonal A(H1N1), A(H3N2), and B as of October-December 2010

			Healthcare workers in hospital and nursing home				Residents in elderly nursing home	
			Vaccination status in the previous season					
			All subjects	Only H1N1pdm vaccine (+)	Only seasonal vaccine (+)	Both	None	All subjects
Number of examinee			532	22	118	351	36	47
A/California/7/2009 A(H1N1)pdm09	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	Pre	142(26.7%)	7(31.8%)	21(17.8%)	111(31.6%)	1(2.8%)	12(25.5%)
		Post	314(59.0%)	13(59.1%)	80(67.8%)	189(53.8%)	30(83.3%)	22(46.8%)
	Geometric mean titer	Pre	13.4	15.1	10.1	15.7	6.5	12.1
		Post	34.1	31.1	46.3	28.8	68.6	23.2
	Mean fold increase		7.0	4.2	13.5	3.1	25.4	4.4
	Response rate (%)		34.8%	27.3%	53.4%	24.2%	80.6%	25.5%
A/Brisbane/59/2007 A(H1N1)(季節性)	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	Pre	351(66.0%)	16(72.7%)	79(66.9%)	240(68.4%)	14(38.9%)	17(36.2%)
		Post	372(69.9%)	18(81.8%)	82(69.5%)	255(72.6%)	15(41.7%)	24(51.1%)
	Geometric mean titer	Pre	45.3	64.2	47.7	48.5	17.1	16.3
		Post	51.4	64.2	55.6	54.4	22.0	26.5
	Mean fold increase		1.3	1.1	1.3	1.3	1.5	2.5
	Response rate (%)		3.4%	4.5%	5.9%	2.0%	8.3%	17.0%
A/Victoria/210/2009 A(H3N2)	Proportion (%) with HI titer $\geq 40$	Pre	276(51.9%)	11(50.0%)	60(50.8%)	187(53.3%)	14(38.9%)	7(14.9%)
		Post	413(77.6%)	16(72.7%)	89(75.4%)	273(77.8%)	30(83.3%)	18(38.3%)
	Geometric mean titer	Pre	28.5	30.1	27.0	29.4	22.4	8.4
		Post	73.6	72.8	64.4	74.8	83.1	19.1
	Mean fold increase		5.0	4.7	5.4	4.6	8.2	6.3
	Response rate (%)		38.9%	40.9%	30.5%	39.3%	58.3%	31.9%

B/Brisbane/60/2008	Proportion (%)	Pre	256(48.1%)	12(54.5%)	54(45.8%)	176(50.1%)	12(33.3%)	20(42.6%)
	with HI titer $\geq$ 40	Post	359(67.5%)	17(77.3%)	77(65.3%)	234(66.7%)	29(80.6%)	28(59.6%)
	Geometric	Pre	26.0	37.6	23.0	28.0	16.8	19.4
	mean titer	Post	46.5	58.4	42.4	44.6	88.1	31.1
	Mean fold increase		4.2	2.0	4.9	2.3	22.1	5.1
	Response rate (%)		20.1%	22.7%	22.0%	15.4%	55.6%	10.6%

---