

Harada, S., Inoue, O., Kozawa, K., Tanaka, R., Noda, M., Okabe, N., Tashiro, M., Mizuta, K., Kimura, H. :Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010 J. Med. Microbiol. (2011 submitted).

Ainai, A., Tamura, S., Suzuki, T., Ito, R., Asanuma, H., Tanimoto, T., Gomi, Y., Manabe, S., Ishikawa, T., Okuno, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H. :Characterisation of neutralising antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine J. Med. Virol. (in press, 2012)

WHO/OIE/FAO F5N1 Evolution Working Group. :Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. J. Influenza. Other Resp. Virus. 6:1-5, 2012

2.学会発表
(省略)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得
無し

2.実用新案登録
無し

3. その他

行政施策への貢献の可能性

(1) 高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応するために重要なアミノ酸置換を特定することにより、新型インフルエンザ出現の可能性を予知または早期発見することが

でき、迅速な対応施策立案と緊急対応の実施に貢献できる。

- (2) これまでの遺伝子、抗原性変異のみの監視では検出できなかった、ヒト型受容体変異とヒト型への馴化過程に対して、地球規模での直接監視体制の確立が可能となる。
- (3) ワクチンを補填し、これまでの抗インフルエンザ薬耐性株にも有効で、備蓄可能な次世代抗インフルエンザ薬の開発基盤が出来る。
- (4) 農林水産省および環境省による高病原性鳥インフルエンザ疫学調査における原因ウイルスの性状解析の資料となる。
- (5) 社会・経済機能が破綻した状況下でのインフルエンザ流行動向監視体制と緊急対応を提言。
- (6) インフルエンザパンデミック対策における野生動物、伴侶動物の公衆衛生学的重要性を発信。
- (7) (H1N1)2009 パンデミックおよび東日本大震災に対する反省から、健康危機管理体制の確立には、行政がパンデミック時の危機事態に対応可能とする新型インフルエンザ特別措置法（仮）等の法的基盤整備を提案。

ウイルスの宿主域規定要因と人への順化機構、 ウイルス病原性の分子基盤の解明

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの伝播は、今のところ限られている。しかし、感染者の体内で H5N1 ウイルスがヒトに適応するための変異を獲得した場合、パンデミックへとつながる危険性がある。そのため、ヒトへの適応変異の知見を蓄積するために、H5N1 ウイルス感染者から分離されたウイルスのアミノ酸変異を解析した。その結果、感染後に患者体内で変化したと思われる患者固有のアミノ酸変異と、感染後の日数変化に伴い出現したアミノ酸変異を確認した。この中からヒトへの適応に重要なアミノ酸を特定することにより、新型インフルエンザ出現の可能性を予知または早期発見することが可能となり、迅速な対応施策立案に寄与することが期待できる。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは時にヒトに感染するが、ヒトからヒトへの伝播は感染者への濃厚接触のみでほとんど例がない。ヒト体内で増殖しやすく、ヒトからヒトへ伝播しやすくなった場合、H5N1 ウイルスがパンデミックを引き起こす可能性がある。どのような変異が起きるとヒトで増殖・伝播しやすくなるのかについての知見を蓄積し、分離ウイルスのリスク評価のための判断材料とすること、さらに H5N1 ウイルスのヒトへの適応メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

対象の患者は 2009 年および 2010 年のベトナムにおける高病原性鳥インフルエンザヒト感染例である。

- ① H5N1 感染者から分離したウイルスを、データベース上の鳥由来 H5N ウイルス株と比較解析を行った。
- ② 同一患者から異なる複数の日に分離したウイルス用い、同一個体内でのウイルス遺伝子の経時的変化を調べた。

（倫理面への配慮）

本研究は、臨床患者から分離したウイルスを用いるため、東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を受け、実施している。
承認番号：21-69-220427

C. 研究結果

- ① データベースの鳥由来の株にはないアミノ酸配列を調べるため、2010 年のベトナムの患者から分離した H5N1 ウイルス 4 株の配列を、既存のウイルス遺伝子配列

(Influenza sequence database (ISD)、GISAID)、近縁の A/chicken/TY167/10、A/chicken/QT517/09、A/duck/TY165/10 と比較し、ヒトにおいて特異的と考えられるアミノ酸配列を調べたところ、それぞれの患者固有の特異的アミノ酸変異が認められた。

- ② 感染後のヒト体内でのアミノ酸変異を解析するため、3人の患者からそれぞれ異なる日に分離されたウイルスを用い、解析したところ、日数変化に伴いアミノ酸変異が出現することが確認できた。これらのアミノ酸変異は、主に PB1, PA, HA, NA, M2 蛋白質に認められた。特に M2 蛋白質では異なる患者で同一の変異が確認された。

D. 考察

本研究により、ヒトの体内で生じたと思われるアミノ酸変異を複数明らかにした。これらのアミノ酸変異には、これまでに報告されていないものが多数含まれている。今後は、同一患者から異なる日に分離されたウイルスを用い、増殖性の違いなどを解析し、どの変異がヒトへの適応に関与しているのかを明らかにする。

E. 結論

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応するために、ヒト体内で生じたと思われるアミノ酸変異を複数同定した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び、緊急対応に関する研究」

—蛍光タンパク質再構成法を用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成機構の解析—

分担研究者: 長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

協力研究者: 鈴木忠樹(国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員)

相内 章(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六室 任期付研究員)

研究要旨: インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼはウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。インフルエンザのポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。我々は、RNA ポリメラーゼ三量体形成の分子機構を生きた細胞内で解析するために、蛍光タンパク質再構成(BiFC)法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに存在するPA-PB1 結合、PB1-PB2 結合を生きた細胞内で可視化するバイオプローブを作成し、三量体形成をリアルタイムでモニタリングするシステムを構築した。

A. 研究目的

ウイルス RNA ポリメラーゼはインフルエンザウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。

インフルエンザの RNA ポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。この三量体は、PB1 をコアとして PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合という二つの直接結合によって形成されている。これらの結合様式は、生化学的手法により解析が進んでおり、結合部位

のみを結晶化することにより構造生物学的な解明も進んでいる。しかしながら、感染細胞内でのポリメラーゼ複合体の形成は、*in vitro*で見られるような二つの単純な直接結合が自律的に形成されることによって起こるのではなく、ウイルス複製の場である核内への能動輸送と密接に関わっていることが知られており、この過程においては、多くの宿主因子との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。また、近年、この相互作用によりインフルエンザ RNA ポリメラーゼの動物種特異性が規定されている可能性が指摘されており、この分子機構を定量的に評価することが RNA ポリメラーゼの動物種特異性およびインフルエンザウイルス感染の動物種特異性を

理解するために重要である。そこで、我々は、この分子機構を解析していくために蛍光タンパク質再構成法 (Bimolecular fluorescence complementation; BiFC) を用いて細胞内で RNA ポリメラーゼ複合体形成とポリメラーゼ複合体核内輸送を同時に定量的に評価できるシステムの構築を試みた。

B. 研究方法

1) プラスミドの作製

BiFC プラスミドは鋳型 cDNA から PA、PB1、PB2 の配列を PCR 法により増幅し、pCXSIN ベクターにサブクローニングし、続いてポリメラーゼ配列の 3' 領域に蛍光タンパク質 Venus の N 末側 1~173 アミノ酸をコードする配列もしくは C 末側 155~228 アミノ酸をコードする配列を挿入し作製した。ポリメラーゼと蛍光タンパク質 Venus の間には NSRTKLGSAANSADGGGGSGGSGGGGGSTQG TGGG からなるリンカー配列を挿入した。PA、PB1、PB2 の鋳型 cDNA は高田礼人博士 (北海道大学) からインフルエンザウイルス A/PuertoRico/8/34(H1N1) の cDNA を供与していただいた。作製したプラスミドは、全てシーケンスを確認した。

2) 細胞培養とトランスフェクション

培養細胞株としてヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞株に SV40 を形質転換させた 293T 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。トランスフェクションは、FuGENE HD (Roche Diagnostics) を用いてメーカー推奨プロトコルに従い実施した。

3) フローサイトメトリー

96well plate に播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細

胞を cell dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で分散させ、1,500 rpm、3 min、4°C で遠心し、2 ml の 2% fetal bovine serum (FBS) 含有 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、1,500 rpm、3 分、4°C で遠心し、400 μ l の 2% paraformaldehyde (PFA) / 2% FBS 含有 PBS に懸濁した。処理した細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。

4) 蛍光顕微鏡解析

35 mm グラスボトムディッシュに播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細胞を 3% PFA で固定した。固定後、4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、共焦点顕微鏡 FV1000D (オリンパス) もしくは冷却 CCD カメラ (浜松フォトニクス) を備えた倒立蛍光顕微鏡で観察し、撮像した。得られた画像データは MetaMorph ソフトウェア (Molecular device) で解析した。

5) Raster image correlation spectroscopy

RICS データ取得は、プラスミドをトランスフェクションした細胞を 37°C に維持したインキュベーターチャンバー (東海ヒット) を備えた共焦点顕微鏡 FV1000D で行った。油浸 60 倍 (1.35 NA) の対物レンズ、励起レーザーは 515nm のアルゴンレーザーを用いた。スキャンスピードは 10.0 μ s/pixel、スキャンエリアは 256x256 の 100 フレームでデータを取得した。電子ズームは 16.4 倍としピクセルサイズを 50 nm とした。RICS データ解析は Fluoview1000 ソフトウェア (オリンパス) の RICS 解析パッケージを用いて行った。この条件での蛍光タンパク質 Venus の細胞質内での拡散係数は $25.1 \pm 7.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となり、他の手法で求めら

れた値と矛盾しない。

C. 研究結果

1) PA—PB1 結合の可視化

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。この三量体は、PB1 をコアとして PA—PB1 結合、PB1—PB2 結合という二つの直接結合によって形成されている。まず始めに、PA—PB1 結合を可視化する BiFC プローブの作製を試みた。ポリメラーゼサブユニットの N 末側に何らかのタンパク質を融合するとポリメラーゼの機能が損なわれるという事が知られていることから、いずれのポリメラーゼも C 末側に蛍光タンパク質を融合した。作製した BiFC プラスミドを適切な組み合わせ (PA—VN と PB1—VC、PA—VC と PB1—VN) で 293T 細胞にトランスフェクションした所、Venus と同様の蛍光が観察された。フローサイトメーターで定量した所、BiFC プラスミドのいずれの組み合わせにおいても同程度の蛍光シグナルが検出された。また、このシグナルは蛍光タンパク質を融合していない PB2 の共発現の影響は受けなかった。次に、共焦点顕微鏡にて BiFC シグナルの細胞内局在を検討した所、PA—PB1 結合を示す BiFC シグナルは、核と細胞質のいずれにも認められた。しかしながら、PB2 を共発現させると、BiFC シグナルは核内のみに認められ、PA—PB1 複合体が核内に集積していると考えられた。

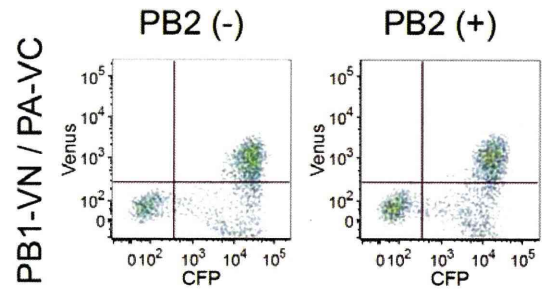


図1 PA—PB1 結合の可視化。PA—PB1 結合形成効率は、PB2 共発現の影響は受けない

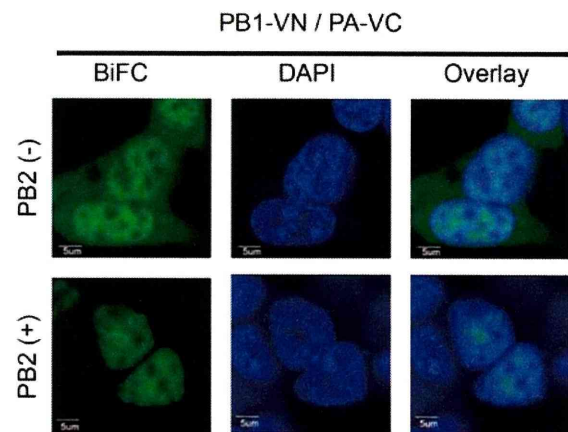


図2 PA—PB1 複合体の細胞内局在。PA—PB1 複合体は PB2 共発現により核内に集積した。

2) PA—PB1 複合体の拡散解析

3量体を形成した RNA ポリメラーゼは、3量体同士が結合し多量体化することが知られている。このポリメラーゼの多量体化の意義については、不明な点が多いが、多量体化することによりウイルス RNA の転写や複製を促進している可能性が指摘されている。そこで、BiFC プローブで可視化された PA—PB1 複合体が、3量体を形成し、さらにより大きな多量体を形成するかどうかを検討するためにレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いた RICS (Raster Imaging Correlation Spectroscopy) 解析を行った。RICS 解析は、空間相関アルゴリズムを用いることにより、LSM 画像から特定領域の拡散係数および分子数を算出することができる画像解析手法であり、細胞の形態情報だけでなく、目標分子の機能解析や分子間相

相互作用の解析を行う事ができる。RICS 解析の結果、PB2 の共発現により PA-PB1 複合体の拡散係数が約 1/2 となっていることが明らかになった。拡散係数が 1/2 となっているということは、分子の大きさが 8 倍になっている事を示しており、PA-PB1 複合体が PB2 の存在下で 3 量体よりも大きな構造体を形成している事が考えられた。

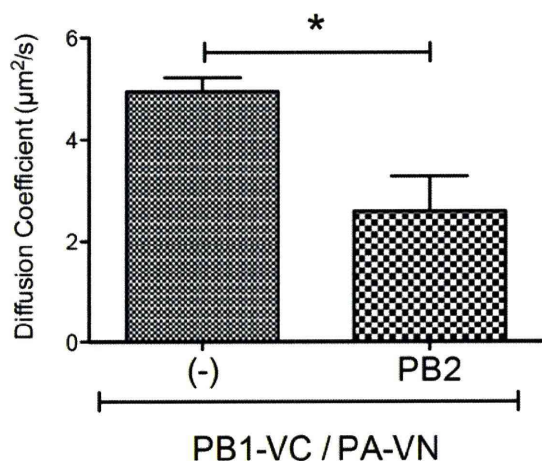


図3 PA-PB1 複合体の拡散解析。PA-PB1 複合体は PB2 存在下で多量体を形成した。

3) PB1-PB2 結合の可視化

次に、3 量体に存在するもう一つの直接結合である PB1-PB2 結合を可視化するための BiFC プローブを作製した。作製した BiFC プラスミドを適切な組み合わせ (PB1-VN と PB2-VC、PB1-VC と PB2-VN) で 293T 細胞にトランスフェクションした所、PB1-PB2 結合を示す BiFC シグナルはほとんど検出されなかった。しかしながら、蛍光タンパク質を融合していない PA を共発現すると PB1-PB2 の BiFC シグナルが核内に検出された。このことより、PB1-PB2 結合は、PA が存在する時のみに形成される事が考えられた。また、この BiFC シグナルの RICS 解析により PB1-PB2 複合体は PA 存在下で 3 量体よりも大きな構造体を形成していた。このことより、PB1-PB2 の BiFC プローブは PA-PB1-PB2 の 3 量体の形成を検出している事が考えられた。

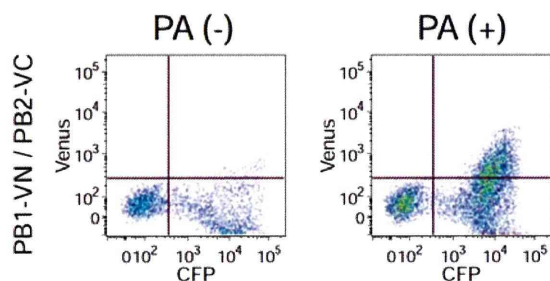


図4 PB1-PB2 結合の可視化。PB1-PB2 複合体は PA 共発現下のみで形成された。

D. 考察

蛍光タンパク質再構成 (BiFC) 法を用いて PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合を生きた細胞内で可視化するバイオプローブを作成し、三量体中のそれぞれの結合を可視化することに成功した。BiFC プローブで可視化された複合体は、PA、PB1、PB2 の 3 つのサブユニットが存在する時に、3 量体よりも大きな多量体を形成する事が RICS 法による拡散解析により明らかになった。また、PA-PB1 結合は、PA および PB1 の発現のみで形成されるが、PB1-PB2 結合の形成には、PA の存在が必要不可欠である事が明らかとなった。X 線結晶構造解析では、PB1-PB2 結合の中に PA が存在しておらず、PA が PB1 と PB2 の相互作用の橋渡しをしていることは考えにくく、PA と PB1 の結合が PB1 に何らかのコンフォメーション変化を促し、PB2 と結合ができる状態に変化していると考えられた。また、PB2 非存在下で核と細胞質に局在していた PA-PB1 複合体が、PB2 の共発現により核内に集積したことから、まず PB1 と PA が結合し、PA-PB1 複合体が形成され、その後、PB1 と PB2 が結合し 3 量体を形成して核内に集積し、さらに多量体化すると考えられた。

本研究で構築したインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの BiFC プローブは生きた細胞内で多段階に起こる三量体形成を定量的に評価するアッセイ系であり、特異性の高いポリメラーゼの機能阻害薬

のスクリーニングや、ポリメラーゼ三量体形成に関わる新たな宿主因子の探索に有用であると考えられる。

E. 結論

蛍光タンパク質再構成 (BiFC) 法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに存在する PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合を生き細胞内で可視化するバイオプローブを作成し、三量体形成をリアルタイムでモニタリングするシステムを構築した。このシステムは特異性の高いポリメラーゼの機能阻害薬のスクリーニングや、ポリメラーゼ三量体形成に関わる新たな宿主因子の探索に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.

2. Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.

3. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Aina A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One*. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.

4. Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.

5. Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol*. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.

6. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.

2. 学会発表

1. 長谷川秀樹、成人T細胞性白血病(ATL)モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第100回日本病理学会総会 2011年4月横浜
2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛

- 志、佐多徹太郎 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
3. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 4. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 5. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 6. Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 7. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 8. Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 9. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE

- EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
10. Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATL:ITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
11. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A HIGHY ATTENUATED SMALLPOX VACCINE LC16M8 AND PROTECTION FROM LETHAL MONKEYPOX XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
12. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
13. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザ ワクチンを目指して 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京
14. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン 登録日平成 23 年 9 月 9 日
2. 実用新案登録
なし

高病原性鳥インフルエンザの流行に備えた薬剤耐性株の安全な感受

性試験系の構築とその評価に関する研究

研究分担者 小田切孝人

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第一室長

研究協力者 高下恵美、高山郁代

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

研究要旨 近年、インドネシア、ベトナム、タイやエジプトを中心に、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し、鳥インフルエンザ（H5N1）を発症した事例が報告されている。各国で分離されている A(H5N1) 株のほとんどは、抗インフルエンザ薬オセルタミビル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、日本国内においても鳥インフルエンザ（H5N1）の発生に対する事前準備として、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する抗インフルエンザ薬感受性試験系を構築し、薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握する体制を整えておく必要がある。そこで我々は、NA-XTD 基質を用いた化学発光法により、A(H5N1) ウイルスの薬剤感受性試験系を構築した。さらに、BSL3 実験室でウイルスを不活化することにより、BSL2 実験室で安全に不活化ウイルスの薬剤感受性試験を行う実験系を確立した。

A. 研究目的

インフルエンザ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）およびザナミビル（商品名リレンザ）が使用されている。2007/08 シーズンからヨーロッパを中心にオセルタミビル耐性のソ連型 A(H1N1) ウイルスが流行し、2008/09 シーズンには世界中に広がった。日本国内でも、2007/08 シーズンには 2.6% であったオセルタミビル耐性 A(H1N1) 株の検出率が、約

半年後の 2008/09 シーズンには 99.6% に急増した。これらの耐性株の多くは、オセルタミビルの投与を受けていない患者から分離されており、ヒトからヒトへの感染伝播によって急速に広がったと考えられる。

近年、インドネシア、ベトナム、タイやエジプトを中心に、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し、鳥インフルエンザ（H5N1）を発症した事例が報告されている。鳥インフルエンザ（H5N1）の治療にもオセルタミビル等の抗インフルエンザ薬が用いられる。

各国で分離されているA(H5N1)株のほとんどはオセルタミビル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をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。2011年1月以降、米国CDCにおいて、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス96株について抗インフルエンザ薬感受性試験が実施され、1株がオセルタミビルに対して耐性を示したことが報告されている。この株はオセルタミビルと同様の作用機序をもつペラミビル(商品名ラピアクタ)に対しても交叉耐性を示した。

日本国内では、インフルエンザの予防および治療薬として、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(商品名イナビル)が使用されている。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、日本国内においても鳥インフルエンザ(H5N1)の発生に対する事前準備として、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する抗インフルエンザ薬感受性試験系を構築し、薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握する体制を整えておくことは公衆衛生上極めて重要である。そこで我々は、NA-XTD基質を用いた化学発光法により、A(H5N1)ウイルスのオセルタミビル、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系の構築を試みた。さらに、バイオセーフティレベル(BSL)2実験室で安全に薬剤感受性試験を実施するための実験系の確立を試みた。

B. 研究方法

鳥インフルエンザ(H5N1)の流行に備えて感染研で保管しているA(H5N1)ウイルスの弱毒化ワクチン製造候補株を用いて、BSL2実験室において、NA-XTD基質を用いた化学発光法により、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系の構築を試みた。

次に、上記のワクチン製造候補株を β -プロピオラクトン添加により不活化し、不活化A(H5N1)ウイルスについて同様の薬剤感受性試験を行って、感受性試験に対する不活化の影響を検討した。

さらに、2011年10月にインドネシアのバリ島で発生した鳥インフルエンザ(H5N1)感染死亡例について、インドネシアNational Institute of Health Research and Development (NIHRD)と共同でウイルス学的解析を進めるために、NIHRDから分与された分離株2株を、BSL3実験室において β -プロピオラクトン添加により不活化し、不活化確認試験終了後にBSL2実験室において薬剤感受性試験を行った。

C. 研究結果

(1) 不活化A(H5N1)ウイルスの薬剤感受性試験系の構築

A(H5N1)ウイルスの弱毒化ワクチン製造候補株(BSL2実験室での取り扱いが承認されている株)を用いて、NA-XTD基質を用いた化学発光法により、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系の構築に成功した。

また、 β -プロピオラクトンの添加により不活化したウイルスと添加前の活性型ウイルスについてそれぞれ薬剤感受性試験を行い、算出されたIC₅₀値を比較したところ、有意な差はなかった。したがって、 β -プロピオラクトンによるウイルスの不活化は、感受性試験結果に影響を及ぼさないことが明らかになった。この実験により、A(H5N1)ウイルスを β -プロピオラクトンで不活化することにより、BSL2実験室でも薬剤感受性試験を安全に実施できるようになった。

(2) インドネシアからの高病原性A(H5N1)鳥インフルエンザウイルスの入手

インドネシア国立衛生研究所 (NIHRD) からWHO インフルエンザ協力センター兼H5N1レファレンス診断ラボである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に、2011年10月中旬にインドネシアバリ島で発生した高病原性A(H5N1)鳥インフルエンザウイルスに感染し、死亡した母子3名から分離した3株のウイルスの提供と共同研究の申し出があった。これを受けて、センターではWHOのPandemic Influenza Preparedness (PIP)協定に従って、NIHRDとStandard Material Transfer Agreement (1)の締結をし、農林水産大臣の輸入許可証の発給後にA(H5N1)ウイルスの輸入をおこなった。11月17日に3株のA(H5N1)ウイルスが届いたが、1株は死滅しており2株のみ性状解析可能なウイルスとして回収できた。

本研究班では、これら2株のA(H5N1)ウイルスの薬剤感受性試験を担当した。

(3) インドネシアA(H5N1)ウイルスの薬剤感受性試験

インドネシアNIHRDから分与されたA(H5N1)分離株2株について、BSL3実験室においてβ-プロピオラクトン添加により不活化後、BSL2実験室においてオセルタミビル、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行った。その結果、2株ともすべての薬剤に対して感受性を保持していることが確認された。

D. 考察

我々は、2009年にパンデミックを起こしたA(H1N1)pdm09ウイルスについて、2009年9月から全国規模の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを開始し、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ている。本研究により、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに関しても、A(H1N1)pdm09ウイルスと同様の

薬剤感受性試験を実施する事前準備が完了した。

A(H5N1)ウイルスはBSL3実験室での取り扱いが規定されており、薬剤感受性試験など生物活性を測定する実験は、設備面や操作面での困難を伴う。そこで、β-プロピオラクトンの添加により、A(H5N1)ウイルスを不活化して薬剤感受性試験を実施できることを証明した本研究により、BSL2実験室でもA(H5N1)ウイルスの薬剤感受性試験を安全に行うことが可能になった。

しかし一方では、ウイルスの不活化およびその確認に2-3週間を要するという迅速性に欠けるという欠点もあることから、緊急時の高病原性ウイルスの感受性試験にはこの方法は適さない。したがって、鳥インフルエンザ(H5N1)の発生に対する事前準備として、BSL3実験室に薬剤感受性試験に対応できる設備や操作マニュアルなどを整備することが今後の課題である。

E. 結論

BSL3実験室において、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスにβ-プロピオラクトンを添加し、不活化することで、BSL2実験室で安全に不活化ウイルスの薬剤感受性試験を行うことができた。本研究により、鳥インフルエンザ(H5N1)の発生に備えて、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて薬剤感受性試験を実施する事前準備が完了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; 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. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1121-1127
Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine.* 2011 Oct 26;29(46):8330-8337
Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(3):237-41.

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

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

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

無し

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、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、田代真人、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

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

オセルタミビル耐性株と感受性株の割合検出法の構築および
ブタ由来 A/H3N2 亜型インフルエンザウイルス特異的検出系の構築について

分担研究者：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

研究協力者：高山 郁代 同上

中内 美名 同上

研究要旨 A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルスの薬剤耐性株出現をモニターできるようにするため、NA タンパク質の 275 番目のアミノ酸変異（H275Y）およびその混在比を検出できる方法を real-time RT-PCR 法により構築した。本方法によりこれまで正確に把握できなかった感受性株および耐性株の混在比を知る事が可能となった。本検出系の構築により、コミュニティでの耐性株流行の広がりをモニタリングする、患者体内での耐性株出現の継時的モニタリングするなどへの応用が可能となった。

また、新型インフルエンザが発生した場合に、すぐに同定検査を全国で行えるようにするためには、新型インフルエンザとなる可能性があるウイルスの同定法を予め構築しておく必要がある。本研究では 2011 年北米大陸においてヒトへの散発的な感染を引き起こしているブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスに特異的で、A/H3 亜型インフルエンザウイルス（香港型）と識別できる real-time RT-PCR 法による検査系の構築を試みた。

A. 研究目的

日本は、世界最大の抗インフルエンザ薬の使用国であり、薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握することは極めて重要である。2010/2011 シーズン以降、日本での A/H1pdm09 亜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では、当所で構築した NA タンパク質の 275 番目のアミノ酸変異（H275Y）を検出する real-time RT-PCR 法が用いられている。患者の体内で薬剤耐性株が出現する過程では、275H を持つ薬剤感受性株と 275Y を持つ薬剤耐性株が混在した状態であることが知られている。そこで、以前我々が構築した 100% 275H、100% 275Y、275H/275Y Mix 株の判定ができる方法に

変更を加え、ウイルス中の 275H と 275Y の構成割合を判定する方法を構築、薬剤耐性株の性状解析を行うことを目的とし、本研究を遂行した。

また、2011 年北米大陸においてブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスのヒトへの感染が散発的に起こった。このウイルスが日本に侵入した場合に備え、現在ヒトで流行している A/H3 亜型インフルエンザウイルス（香港型）と識別できる特異的な real-time RT-PCR 法による検査系の構築を行う事を目的とし、本研究を遂行した。

B. 研究方法

a) 275H と 275Y の構成割合を判定できる系の構築

1. 反応系の最適化

臨床検体および分離株中の 275H と 275Y の構成割合を 20%間隔で判定できるよう、以前に我々が構築した real-time RT-PCR 法による 275H、275Y、275H/275Y Mix 株の検出系に変更を加えた。また、275H または 275Y を含む HA の RNA を新たに合成し、それらの比率を変えた混合液を用いて新たに構築した検出系の検出誤差範囲を確認した。

2. 新たに構築した検出系を用いた薬剤耐性株の性状解析

新たに構築した検出系を用いて、臨床検体ならびに培養細胞によるウイルス分離培養液中の 275H と 275Y の構成割合を求めた。結果をもとに、培養細胞でウイルス分離や継代をする際に 275H と 275Y の構成割合に変化がないか検討を行った。

(b)ブタ由来 A/H3N2 亜型インフルエンザウイルス特異的検出系の構築

1. プライマーとプローブの設計

過去 5 年間にヒトで流行した A/H3 亜型インフルエンザウイルスおよび近年北米大陸でブタから分離された A/H3 亜型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列のアライメントを構築した。それを元にそれぞれに共通な領域にプライマーを設計し、それぞれに特異的な領域にプローブを設計した。

2. 検出感度および特異性の検討

米国 CDC より分与されたブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス (A/Indiana/10/2011) および近年日本で流行しているヒト由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスから RNA を抽出し、それを鋳型に構築した検出系の感度および

特異性を検討した。また、これまで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で構築した A 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する real-time RT-PCR 検出系 (検出感度 7.5 copies/reaction) との感度比較を行った。

C. 研究結果

(a)275H と 275Y の構成割合を判定できる系の構築

1. 反応系の最適化

従来の検出系では、プローブ配列の 5' 末端の塩基置換を識別する事により H275Y 変異の検出を行っていたが、今回の検出系では、プローブ中央の塩基置換を識別する事により H275Y 変異を検出できるように変更した。また、real-time RT-PCR の反応条件については、増幅サイクル数を 35 に減らした。以上の変更により、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ copies/reaction の範囲のウイルス RNA について 275H と 275Y の構成割合を判定する事のできる検出系を構築した。さらに高感度な検出系であるため、抽出した RNA を用いる事により臨床分離株だけではなく臨床検体の検査にも使用可能となった。また、この系の 275H と 275Y の構成割合の誤差範囲は ±5% 以内であり、簡潔かつ高精度に 275H と 275Y の構成割合を判定できる系であることが示された。

2. 臨床検体および細胞分離株中の薬剤耐性株の性状解析

従来の検出系により 275H と 275Y の Mix である事が確認できた 1 例の臨床検体ならびにこの臨床検体由来の MDCK 細胞を用いた細胞分離株について、今回構築した系を使用して、275H と 275Y の構成割合を判定した。その結果、臨床検体では 40~60% 275Y、細胞分離株では 60~80% 275Y となった。また、この細胞分離株を MDCK 細胞で 5 代継代したところ、さらに 20% 程度 275Y の割合が増える傾向が示

された。また、別の1例の臨床検体ならびにこの臨床検体由来の MDCK 細胞を用いた細胞分離株について、構成割合を判定した結果、臨床検体では 60~80% 275Y、細胞分離株では 100% となった。

(b)ブタ由来 A/H3N2 亜型インフルエンザウイルス特異的検出系の構築

1. プライマーとプローブの設計

共通プライマー、 s-hH3 F2:
agccaacaarctgtaatyccgaatatcg、 s-hH3 R2:
ccctgtgctgtaatacaaatgatgctc。

特異的プローブ s-hH3 P2 sw:
FAM-gtaaggggtgtctccagcata-MGB (ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用)、
s-hH3 P2hu:
VIC-gtaaggaatatccctagcagartaag-MGB (ヒト由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用)。

2. 検出感度および特異性の検討

構築したブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プローブは A/Indiana/10/2011 ウイルス RNA を特異的に検出し、ヒト由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プローブはヒトから分離されたウイルス由来 RNA を特異的に検出し、双方で交差反応性は見られなかった。また、現在ヒトで流行している A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス由来 RNA との交差反応性も見られなかった。A 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する real-time RT-PCR 検出系 (検出感度 7.5 copies/reaction) との感度比較を行ったところ、検出感度は同程度であった。

D. 考察

(a)275H と 275Y の構成割合を判定できる系の構築

今回構築した系によって、A/H1pdm09 亜型

インフルエンザウイルス中の 275H と 275Y の構成割合を求めることが可能となった。この系は、現在多くの報告がある pyrosequence を用いる方法に比べ、より早く、安価に行うことができる利点がある。また、目視により散布図から一度に多検体の結果を判定することができ、解析も容易に行うことができることから、患者の体内での耐性株の出現を継続的にモニタリングする等の利用方法が期待できる。

また、今回の臨床検体ならびにその分離株を使用した結果から、培養細胞を使用して分離するとウイルス中の 275H と 275Y の構成割合が変化し、患者の体内でのそれらの構成割合と異なる可能性が示された。同様の現象は、今までも報告があり、今後、メカニズムの解明が必要である。

(b)ブタ由来 A/H3N2 亜型インフルエンザウイルス特異的検出系の構築

今回構築した検出系は高感度また特異的にブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスを検出できることから、このウイルスの日本への侵入に備える事が可能となった。

E. 結論

インフルエンザウイルスは抗インフルエンザウイルス剤であるオセルタミビルの使用により 275Y 変異を有した耐性株が体内で出現する可能性がある。この時、臨床検体から検出されるウイルスは完全に耐性株に置き換わってしまった場合と感受性株と耐性株が混在する場が考えられ、コミュニティでの耐性株の流行の広がりをモニタリングする上でも、これら混在比を調べる事ができる本検出系は非常に有用となる。また、患者体内での耐性株の出現を継続的にモニタリングする等の利用方法も期待でき、免疫不全症など長期にインフルエンザ罹患する可能性のある患者に対して、オセルタミビルの効果を推定する事が可能になると考えられる。また、臨床検体中と細胞分離株で

混在比が大きく異なるケースもあり、耐性株の性状解析や耐性株出現機序の解明が今後は重要な課題となる。

また、新型インフルエンザとなる可能性があるウイルスの同定法を予め構築しておく事で、そのウイルスを由来とした新型インフルエンザが発生した場合には同定検査をすぐに行う事が可能になる。この場合、全国の地方衛生研究所および検疫所にも試薬配布を行えば、全国ですぐに同定検査を行う事が可能になる。既に検出系が構築されていれば、試薬配布期間を含めても1〜3日以内に全国で検査を行える事が可能と考えられる。

今後は、どこの施設でも同じ精度・特異性・感度で検出できる様にするためには、各施設で検査精度を管理する事が重要になる。外部精度管理あるいは研修などを行って各施設の検査精度を維持していく事もまた重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C; The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, In Press, 2012

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; 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(7):1121-1127, 2011

Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S; Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus

nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*. In press, 2012

2. 学会発表

Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Ikuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. *Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance*, Rio de Janeiro, November, 2011

Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Koichiro Iha, Mina Nakauchi, Satoshi Taniguchi,

Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa: Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

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