

ウイルス

インフルエンザA/WSN/33(H1N1)株(川崎医科大学微生物学教室より譲渡)を用いた。WSN株は1933年にヒトから分離されたインフルエンザA(H1N1)株をマウスに馴化させたウイルスであり、気管支・肺以外でも黒質・海馬に感染し、神経毒性を起こす全身感染性のインフルエンザウイルスである。今回の実験ではニワトリ受精卵(10日卵)の漿尿膜腔にWSN株を接種後、2日間培養して得られたウイルスを使用した。ウイルス力価はプラークアッセイにより測定し、 1.5×10^7 PFU/mlと高力価であった。

プラークアッセイ

細胞はMadin-Darby canine kidney (MDCK) cells、培養液はDulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)に5% Bovine Serum Albumin(BSA)を加えた液を用いた。寒天は1%アガロース液とプラークアッセイ培地(2×MEM, MEM Vitamin Solution, 10%D-glucose, 0.25%Trypsin)の等量混合液を用いた。プラークが形成後、ホルマリン10倍希釈液で固定し、クリスタルバイオレット液で染色した。

ウイルス感染

両群とも吸入麻酔(イソフルラン)下でウイルス接種を行った。肺炎群ではマイクロピペットを用いて、ウイルスの経鼻接種を行った。脳炎群ではマウスの両耳を結ぶ線と両眼(前縁)を結ぶ線との中間で正中線より右へ2mmずらした部位に30ゲージ針(0.9mm)を1mm穿刺し、ウイルスの脳内接種を行った。両群とも対照としてPBSを用いた。全ての群において、接種後10日目まで生存確認を行った。接種後30分以内に窒息、痙攣などで死亡したマウスは除外した。また、肺炎群では脳組織中のウイルス増殖がないこと、脳炎群では肺組織中のウイルス増殖

がないことを確認した。

組織中のインフルエンザウイルス定量

(Table 1)

ウイルス感染直後、および感染1、3、5日後に吸入麻酔(イソフルラン)下でマウスの肺組織と脳組織を採取した。肺炎群ではBALF未施行の左肺下1/2を採取し、脳炎群ではウイルス接種した右脳前1/2を採取した。RNeasy Plus Mini(Qiagen Inc, Hilden, Germany)を用いてRNAを抽出し、1μgのRNAをRETR0script(Applied Biosystems)を用いてcDNAに逆転写した。逆転写後のサンプルをPCR amplificationにて増幅し、7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いてインフルエンザウイルス(M1タンパク)特異的mRNA量を測定した。PCRプローブとプライマーはSigma-Aldrich Japan(Tokyo, Japan)で設計したものをを用いた。

Table 1 インフルエンザウイルスA型(M遺伝子)PCRプローブとプライマー

TaqMan	probe
5' -GCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGAC-3'	
Forward	primer
5' -CGTTCTCTCTATCATCCCGTCAG-3'	
Reverse	primer
5' -GGTCTTGCTTTAGCCATTCCATG-3'	

凍結切片作製

ウイルス感染 1、3、5 日後に吸入麻酔下でマウスの肺組織と脳組織を採取し、O. T. C. コンパウンドで包埋し、クリオスタットを用いて凍結切片(4μm)を作製し、アセトン固定を行った。

ウイルスの免疫組織染色

インフルエンザウイルス抗原を検出するために 1 次抗体 (Anti-Influenza A Virus Nucleoprotein antibody, Abcam, Cambridge, UK) を 500 倍希釈、2 次抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG antibody, invitrogen, CA, U.S.A.) を 200 倍希釈で用いた。核は DAPI 封入剤 (VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium, VECTOR LABORATORIES INC.) で染色した。得られた組織標本をオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000 Generation II, KEYENCE) を用いて観察した。

炎症細胞の免疫組織染色

肺組織中の好中球を検出するために、1 次抗体 (Anti Iba1, Rabbit for Immunocytochemistry, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を 100 倍希釈で用いた。脳組織中のミクログリアを検出するために、1 次抗体 (Purified anti-mouse Ly-6G, BioLegend Inc, CA, U.S.A.) を 300 倍希釈で用いた。2 次抗体はそれぞれシンプルステインマウス MAX-PO (R, ニチレイバイオサイエンス)、(Rat, ニチレイバイオサイエンス) を用いた。発色は DAB・H₂O₂ を用いて行った。核は H.E. 染色にて描出した。

サイトカイン・ケモカインの測定

ウイルス感染 1、3、5 日後に吸入麻酔 (イソフルラン) 下でマウスの血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、脳脊髄液 (CSF) を採取した。血清、BALF、CSF のサイトカイン・ケモカイン (G-CSF、GM-CSF、IFN γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-13、IL-15、RANTES、MCP-1、IL-12、KC、MIP-1 α 、IP-10、TNF α) を Mouse Cytokine/Chemokine 96-Well Plate Assay (Millipore, U.S.A.) を用いて Luminex 100/200 システム (Luminex Technologies Inc, Austin, TX) で測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験計画については、岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門の承認を受け、規定を遵守して実験を行った。

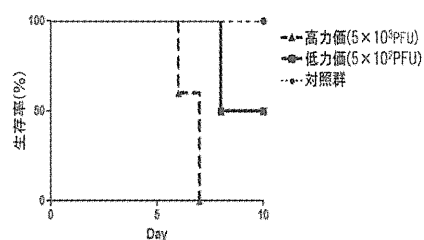
C. 研究結果

ウイルス感染後の生存率 (Fig. 1)

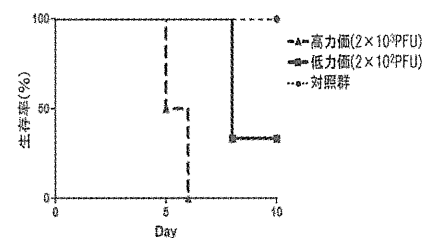
肺炎群は高力価投与群 (5×10^3 PFU/匹)、低力価投与群 (5×10^2 PFU/匹)、対照群 (PBS) の 3 群に分けた。同様に、脳炎群も高力価投与群 (2×10^3 PFU/匹)、低力価投与群 (2×10^2 PFU/匹)、対照群 (PBS) の 3 群に分けた。肺炎群、脳炎群ともに 10 日目まで生存確認を行なった。対照群は両群とも全例生存した。低力価投与群は、肺炎群では 50%、脳炎群では 60% 死亡した。高力価投与群では、両群ともに 7 日目までに 100% 死亡した。以降の実験は両群ともにマウスの致死量である高力価のウイルス量を用いて行った。

Fig. 1 肺炎群および脳炎群の生存曲線

A. 肺炎群



B. 脳炎群



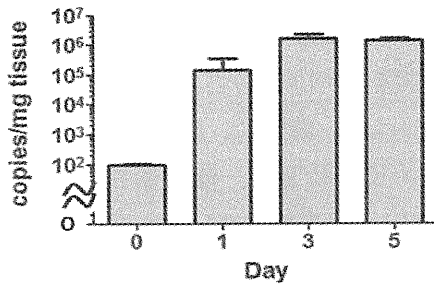
感染臓器中のウイルス量 (Fig. 2)

ウイルス感染直後では感染臓器中のウイルス量は肺炎群、脳炎群ともに約

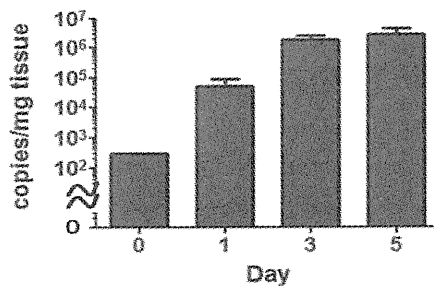
10²copies/mg tissueであった。感染1日目以降からウイルス増殖がみられ、3日目には両群ともに約10⁶copies/mg tissueまで増殖した。

Fig. 2 感染臓器中のウイルス量 (平均値+SD)

A. 肺炎群



B. 脳炎群



病理学的評価 (Fig. 3)

肺炎群、脳炎群の感染3日目以降の病理学的評価を行った。肺炎群の肺組織では、気管支を中心にウイルス抗原が検出され、気管支周囲から肺実質にかけて好中球の浸潤が認められた。脳炎群の脳組織では、第三脳室内・第四脳室内・大脳皮質にウイルス抗原が検出された。第三脳室内では3日目からウイルス抗原が検出され、5日目にミクログリアの増殖が認められた。第四脳室でも同様に、3日目からウイルス抗原が検出され、5日目にミクログリアの増殖が認められた。大脳皮質では3日目には脳実質周囲にウイルス抗原が検出されたが、炎症細胞は検出されなかった。その後、5日目

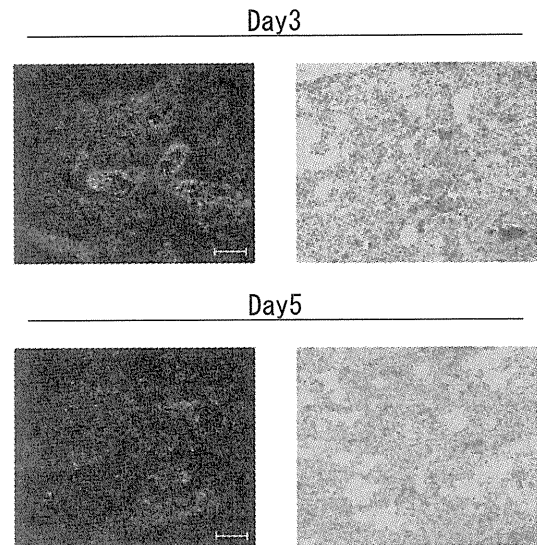
にはウイルス抗原が脳実質に検出されたと同時に、周辺に炎症細胞の集簇も認められた。

Fig. 3 感染臓器の免疫組織染色

(scale bar = 100 μm)

A. 肺炎群

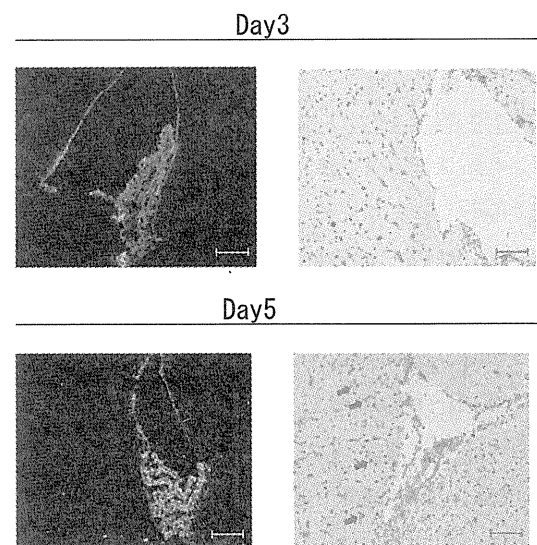
ウイルス抗原 好中球



B. 脳炎群

a. 第三脳室

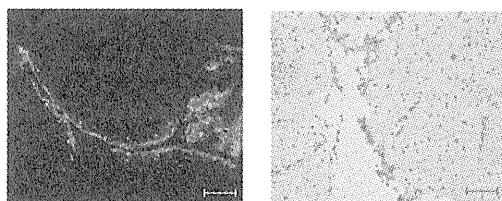
ウイルス抗原 ミクログリア



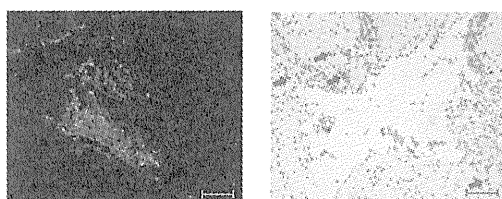
b. 第四脳室

ウイルス抗原 ミクログリア

Day3



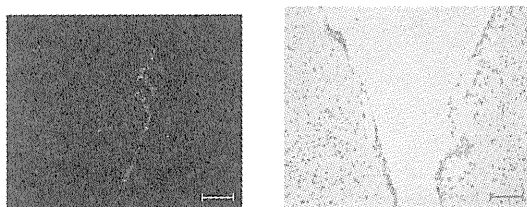
Day5



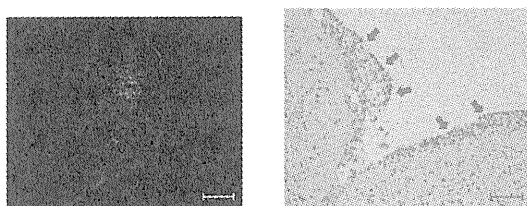
c. 大脳皮質

ウイルス抗原 炎症細胞

Day3



Day5



血清中のサイトカイン・ケモカイン

(Fig. 4)

感染に対する全身の免疫応答を解析するために、血清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。肺炎群では G-CSF、IFN γ 、IL-6、RANTES、MCP-1、IL-12、KC、MIP-1 α 、IP-10、TNF α の上昇が認められた。脳炎群では G-CSF、IFN γ 、IL-1 α 、MCP-1、IL-12、KC、MIP-1 α 、IP-10、TNF α の上昇が認められた。両群ともに血清中で炎症性サイトカイン

の上昇を認め、サイトカインプロファイルはほぼ同様の傾向を示した。

BALF および CSF 中のサイトカイン・ケモカイン (Fig. 5) (Fig. 6)

感染に対する局所反応をみるために、肺炎群では BALF 中、脳炎群では CSF 中のサイトカイン・ケモカインを測定した。BALF は PBS を用いて採取したため希釈されており、CSF と値を直接比較できないため、各群におけるサイトカイン・ケモカインの特徴と傾向を比較した。G-CSF、IFN γ 、IL-6、RANTES、MCP-1、IL-12、KC、MIP-1 α 、IP-10、TNF α は両群で上昇が認められた。特に IP-10 は肺炎群において、他のサイトカイン・ケモカインと比較し、著明な上昇が認められた。また、IL-10、IL-13 は脳炎群でのみ上昇が認められた。局所で特徴があったサイトカイン・ケモカインは肺炎群では IP-10 であり、脳炎群では IL-10、IL-13 であった。IL-10 や IL-13 の抗炎症性サイトカインは肺炎群では上昇が認められず、脳炎群でのみ感染 3 日目、5 日目に対照群と比較し有意な上昇が認められた。IP-10 は特に肺炎群で上昇し、感染 3 日目、5 日目に対照群と比較し有意な上昇が認められた。

Fig. 4 Day3 血清中のサイトカイン・ケモカイン（平均値）

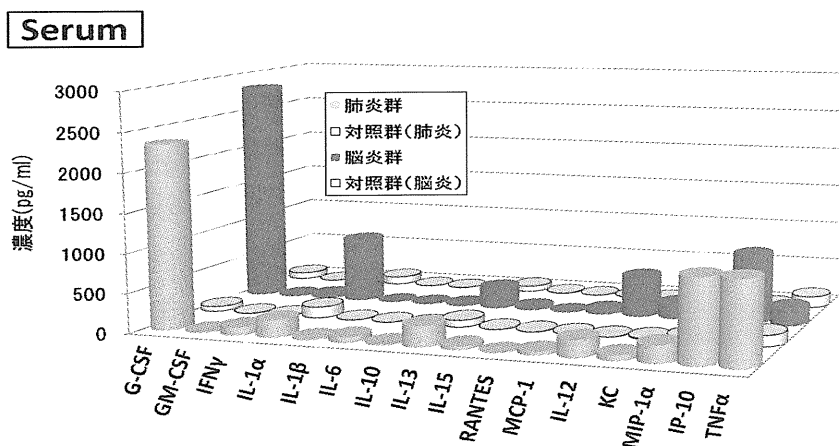


Fig. 5 Day3 局所（肺炎群はBALF、脳炎群はCSF）のサイトカイン・ケモカイン（平均値）

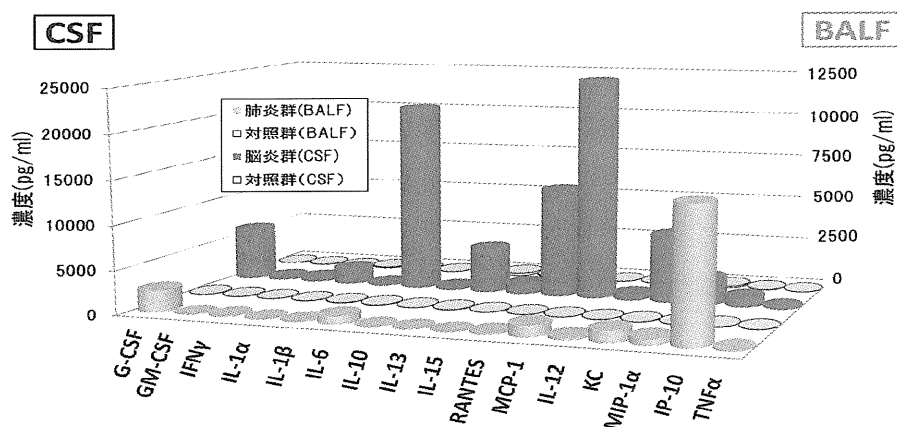
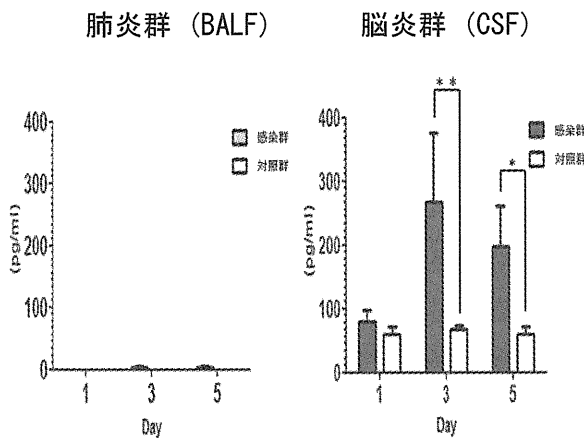


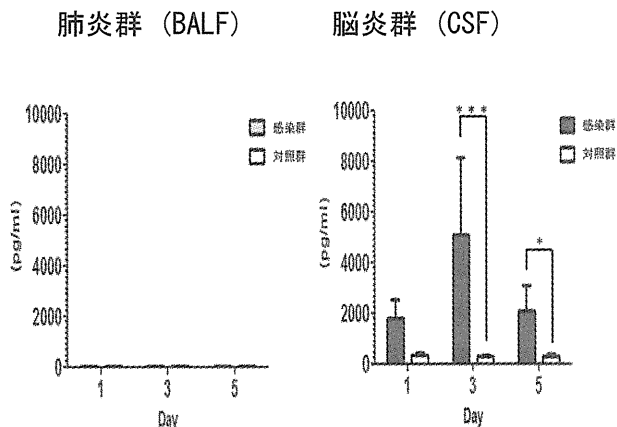
Fig. 6 局所のサイトカイン・ケモカイン

(平均値+SD、* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001)

A. IL-10



B. IL-13



D. 考察

インフルエンザは小児や基礎疾患を持つ患者を中心に重症化しやすく、ARDSやインフルエンザ関連脳炎/脳症など重篤な病態を引き起こすことが知られている。インフルエンザ肺炎やインフルエンザ関連脳炎/脳症における各々の病態の違いについて今までにも様々な報告がされている。インフルエンザA/H1N1/2009 pdmに感染し肺炎を引き起こした患者の血清中ではG-CSF、IL-6、IL-10、IL-15、TNF α が上昇したとの報告があり、また、インフルエンザ肺炎マウスモデルにおいて血清中ではIL-1 α 、IL-6、RANTES、KC(IL-8)が上昇し、BALF中ではIFN γ 、KC(IL-8)、RANTES、MIP-2、MCP-1の上昇が認められたとの報告がある。また、可逆性脳梁膨大部病変を有する脳炎/脳症患者の血清中ではIL-6、sTNFR1、IL-10が上昇し、CSF中ではIFN γ 、sTNFR1、KC(IL-8)、G-CSFに加え、抗炎症性サイトカインのIL-10の上昇もみとめられたとの報告がある。一方で、インフルエンザA/H1N1/2009 pdmによる肺炎を引き起こした患者の血清中ではIFN γ 、TNF α 、IL-8の低下が認められたという報告もあり、局所と全身の免疫応答の相関については明確な結論が出ていない。そこで我々は、インフルエンザによる肺炎と脳炎における全身および局所を比較するため、サイトカイン・ケモカインプロファイルを作成した。

本研究では、同一の病原体が異なる組織へ感染した場合の生体の反応を観察するため、多臓器に感染能を持つインフルエンザA/WSN/33(H1N1)株を使用した。感染部位を明確にさせるため、肺炎群は経鼻接種法、脳炎群は脳内接種法を用いて感染させた。いずれの感染臓器においてもウイルスの増殖が認められ、病理学的にも感染細胞でウイルス抗原が検出された。ウイルス抗原の検出に伴い、肺炎群では好中球の浸潤がみ

られ、経時的に病変増悪を認めた。これに対し、脳炎群ではウイルス抗原周囲へのミクログリアの増殖や好中球やリンパ球などの炎症細胞の集簇を認めた。今回の脳炎の発症は以下の病態が考えられた。脳内接種したウイルスが、髄液内を通過して脳室内の上皮細胞に到達し感染した後、第三・第四脳室内に到達した。その後、脳実質である大脳皮質にウイルスは侵入し、脳炎に発展したと考えられる。脳内接種を用いた過去の研究論文によると、感染3日目はウイルス抗原が脳室内や髄膜でのみ検出され、7日目では黒質や海馬など脳実質からも検出されたという報告があり、本実験のウイルス抗原が検出された時期も同様の経過をとった。

感染に対する全身の免疫応答を反映する血清中のサイトカイン・ケモカインは、肺炎群と脳炎群の両群で好中球の分化増殖を促すG-CSF、抗ウイルス作用を示すIFN γ 、NK細胞の活性化やIFN γ の産生促進するIL-12、好中球の遊走活性化するKC、単球やマクロファージの遊走活性化するMCP-1、T細胞を誘導するIP-10、局所炎症作用を起こすTNF α などの炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。両群のサイトカイン・ケモカインプロファイルはほぼ同様の傾向を示した。

一方、局所のサイトカイン・ケモカインの特徴を検討すると、傾向に大きな差がみられた。肺炎群では炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇しており、特にIP-10が他の炎症性サイトカイン・ケモカインに比べ著明な上昇が認められた。好中球が産生するサイトカイン・ケモカインの中にIP-10があり、過去にIP-10を投与したマウスにおいて、炎症細胞の誘導が増強され肺炎が重症化するという報告がある。今回の肺炎群では急性期に浸潤した好中球によって産生されたIP-10により、T細胞が誘導され、

炎症による組織破壊を来す機序がインフルエンザ肺炎の病態の一つとして考えられた。肺炎群で上昇したサイトカインは主に炎症の誘導に働いたと考えられた。これに対し脳炎群では、炎症性サイトカイン・ケモカインに加え、肺炎群で上昇がみられなかった抗炎症性サイトカインのIL-10、IL-13の上昇が認められた。脳内では炎症性サイトカインと同期して、抗炎症性サイトカインも上昇しており、過剰な炎症反応の抑制に働いたのではないかと考えられる。

A/WSN/33 (H1N1) 由来の肺炎と脳炎に対する全身および局所の免疫応答の解析から以下の点が推察される。全身の免疫応答として、肺炎群、脳炎群ともにほぼ同様の炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇していた。これに対し、局所では両群で異なる反応を示した。肺炎群では炎症性サイトカイン・ケモカインのみが上昇していたのに対し、脳炎群では炎症性サイトカイン・ケモカインのみならず、抗炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇も認められた。(Fig. 7) 肺組織は常に大気に暴露されており外敵の侵入を受けやすい状態におかれているため、酸化障害や感染症など強力なストレスに対する生体応答の場となっている。したがってストレス排除のため強力な免疫応答を呈する。これに対して脳組織は体外環境由来のストレスから嚴重に保護されている。仮にストレスに暴露された場合にはストレス排除目的の他に組織保護目的の生体反応を呈している。各組織の役割の違いが免疫応答の差に反映されていると考えられる。今回、局所で上昇したサイトカイン・ケモカインの産生細胞の詳細は判明されていない。今後は産生細胞の同定が必要と考えられる。また、異なるウイルス種による反応の比較や、ウイルス以外の病原体による反応の比較も評価する必要がある。

現在、臨床の治療を行う上で病態を判断

する生体検体の多くは血液や尿である。これらは主に全身の生体反応を反映している。しかし、今回の研究で肺炎と脳炎という異なる病態において、全身の免疫応答は同様の傾向を示したが、局所の免疫応答は異なっており、血液所見だけでは必ずしも局所の病態を把握できるとは限らないということが示された。今後、感染症治療において病態に応じた適切な治療を行うためには、血液のほかに感染局所部位の検体も用いて病態把握していかなければならないと考える。

Fig. 7 全身および局所のサイトカイン・ケモカインプロファイル

Cytokines/ chemokines		Inflammatory		Anti- inflammatory
Influenza (WSN)	Pneumonia	Systemic	↑ IFN γ , KC, IL-12, TNF α etc.	N.D.
		Lung	↑ IFN γ , KC, IL-12, TNF α etc.	N.D.
	Encephalitis	Systemic	↑ IFN γ , KC, IL-12, TNF α etc.	N.D.
		Brain	↑ IFN γ , KC, IL-12, TNF α etc.	↑ IL-10, IL-13

E. 結論

インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1) 株感染の肺炎と脳炎における全身および局所のサイトカイン・ケモカインプロファイルを比較検討した。肺炎群、脳炎群ともに全身では炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。一方、局所において肺炎では炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇し、脳炎では炎症性サイトカイン・ケモカインに加え抗炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。局所は病態を反映しやすく、重症感染症の治療において局所反応の重要性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Okumura A., Morishima T. et. al:
Severe form of encephalopathy
associated with 2009 pandemic
influenza A (H1N1) in Japan. J Clin
Virol. 56(1):25-30, 2013
- ・ Yashiro M., Morishima T. et. al:
Redox-active protein thioredoxin-1
administration ameliorates
influenza A virus (H1N1)-induced
acute lung injury in mice. Crit Care
Med. 41(1):171-81, 2013
- ・ Okumura A., Morishima T. et. al:
Unexpected cardiopulmonary arrest
associated with influenza: our
experience during the 2009 pandemic
in Japan. Influenza Other Respi
Viruses. , 2012

2. 学会発表

- ・ Yashiro M., Morishima T. et. al:
Difference in the profile of locally
produced cytokines/chemokines in
pneumonia and encephalitis of mice
16th US-Japan Acute Respiratory
Infections Panel Meeting, March,
2013, Singapore
- ・ 山田睦子、八代将登、森島恒雄ら：
インフルエンザ感染における局所サイ
トカイン・ケモカインの動態. 第 60 回
日本ウイルス学会. 2012 年 11 月／大阪
- ・ 藤井洋輔、八代将登、森島恒雄ら：
インフルエンザ感染における局所サイ
トカイン・ケモカインの動態. 第 116 回
日本小児科学会. 2013 年 4 月／広島

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新型インフルエンザのウイルス学・病態解析と感染制御法の検討

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

ハムスターにおいて、ヒトインフルエンザウイルスがどのように個体間伝播するかを明らかにするため、A/California/04/09(H1N1)を用いて、直接接触伝播試験および飛沫伝播試験を行い、伝播性を解析した。その結果、直接接触伝播試験では、実験に用いた全てのハムスターで伝播することが確認できた。さらに飛沫伝播試験では、4匹中2匹で伝播が起こったことが確認できた。これらの結果から、A/California/04/09(H1N1)は、ハムスターにおいて飛沫を介した個体間伝播を起こすことが明らかとなり、ハムスターのインフルエンザウイルス飛沫感染モデルの可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで、ヒトインフルエンザウイルスの個体間伝播に関する研究は、フェレットを用いて行われてきた。しかし、フェレットはマウスやラットに比べ、購入費や飼育費、扱いやすさなどの観点から、最適なモデル動物とはいえない。近年、ヒトインフルエンザウイルスに特異的なレセプターであるシアル酸 (Sia α 2,6Gal) が、ハムスターの上気道に多く存在することが明らかにされた。そこで、ハムスターにおいて、ヒトインフルエンザウイルスがどのように個体間伝播するかを明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

B. 研究方法

2009年にパンデミックを起こしたインフ

ルエンザウイルス (A/California/04/09(H1N1)[Cal04]) を用いて、まず、ハムスターにおけるウイルスの増殖性について解析した。次に、感染ハムスター：非感染ハムスターを同居飼育する直接接触伝播試験 (3匹：3匹/1ケージ) と、感染ハムスター：非感染ハムスターをメッシュ板で仕切って飼育する飛沫伝播試験 (1匹：1匹/1ケージ×4組) を行った。両試験とも、感染群へのウイルス接種から1日後に非感染群を同居させた。感染後、体重変化を観察するとともに、鼻腔洗浄液中のウイルス量と、中和抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. ハムスターにおけるウイルスの増殖性
4週齢のメスのシリアンハムスターに、

1.0x10⁶PFU/ml/animal の Cal04 ウイルスを感染させ、体重変化 (n=3) と、感染後 3 日目 (n=3) および 6 日目 (n=3) の各臓器でのウイルス量を調べた。体重は、感染後 2 日目から 3 匹中 2 匹のハムスターで減少が確認され、5 日目または 6 日目から回復した。各臓器でのウイルス量は、全てのハムスターで感染後 3 日目に鼻甲介、気管、肺で高いウイルスカ価を示し、6 日目には、減少傾向が認められた。このことから、Cal04 ウイルスはハムスターにおいて効率よく増殖することが明らかとなった。

2. ハムスターにおけるウイルスの直接接触伝播

1. と同じ条件で、ハムスター3 匹に Cal04 ウイルスを感染させ、ウイルス接種 1 日後に非感染ハムスター3 匹を同一ケージに同居させ、体重変化と、鼻腔洗浄液中のウイルス量を測定した。その結果、接種ハムスターは、感染後 2 日目から体重が減少し、非感染ハムスターは 6 日目から体重が減少した。さらに、ウイルス接種から 4 日目 (同居から 3 日目) または 8 日目 (同居から 7 日目) に、3 匹全ての非感染ハムスターの鼻腔洗浄液からウイルスが検出された。このことから、Cal04 ウイルスが個体から個体へと接触伝播することが確認できた。

3. ハムスターにおけるウイルスの飛沫伝播

1. と同じ条件で、ハムスターに Cal04 を感染させ、メッシュ板で 2 つに仕切ったケージの一方にて飼育した (1 匹/1 ケージ)。ウイルス接種 1 日後に、メッシュ板で仕切られたもう片方の区画に、非感染ハムスターを同居させ、飛沫伝播の有無を調べた (1 匹 : 1 匹/1 ケージ×4 組)。その結果、非感染ハムスター4 匹中 2 匹で、鼻腔洗浄液からウイルスが検出され、中和抗体価の上昇

が認められた。このことから、Cal04 は、ハムスターにおいて飛沫を介したウイルス伝播を起こすことが確認された。

D. 考察

本研究結果から、ハムスターにおいて Cal04 ウイルスが飛沫伝播することが明らかとなった。今後は、他の季節性ヒトインフルエンザを用いて飛沫伝播実験を行い、飛沫伝播に関わるメカニズムやウイルス因子を解明する。

E. 結論

A/California/04/09 (H1N1) は、ハムスターにおいて飛沫を介した個体間伝播を起こすことが明らかとなり、ハムスターのインフルエンザウイルス飛沫感染モデルの可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

Uraki R, Kiso M, Shinya K, Goto H,
Takano R, Iwatsuki-Horimoto K,
Takahashi K, Daniels RS, Hungnes O,
Watanabe T, Kawaoka Y. Virulence
determinants of pandemic
A(H1N1)2009 influenza virus in a
mouse model. *J Virol* 87:2226-2233,
2013.

Inagaki A, Goto H, Kakugawa S,
Ozawa M, Kawaoka Y. Competitive
incorporation of homologous gene
segments of influenza A virus into
virions. *J Virol* 86:10200-10202, 2012.

2. 学会発表

市古有里絵、岩附研子、野田岳志、河岡
義裕「ハムスターにおけるインフルエン
ザウイルス飛沫伝播モデルの確立」2nd
Negative Strand Virus-Japan Symposium,
沖縄、2013年1月15日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

平成 24 年度分担研究報告書

「インフルエンザウイルス高増殖性を示す新規 MDCK 細胞の開発に関する研究」

研究分担者 田代 真人 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長

研究要旨

インフルエンザはインフルエンザウイルスを病原体とする急性呼吸器感染症（ARI）で、毎年世界中で流行を起し問題となっている。インフルエンザ対策にはワクチン接種が有効とされているが、パンデミックの発生に備えて、短期間に大量のワクチンを供給する必要があるため、従来の孵化鶏卵培養法に代わり、細胞培養法を用いた新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。MDCK 細胞はインフルエンザウイルスの分離効率及び増殖性が良いため、細胞培養インフルエンザワクチン製造に用いられる候補細胞の一つである。しかし、パンデミックワクチンを短期間大量に必要とする際には、よりウイルス生産効率の優れた細胞を開発する必要がある。そこで本研究では、細胞培養ワクチンの実用化に向けて従来の MDCK 細胞よりもウイルス増殖能力が高い新規 MDCK 細胞の開発を試みた。I 型インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子である IRF7 に対する shRNA を安定発現させた新規 MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させると、コントロール MDCK 細胞と比較して HA 価が 2~8 倍上昇した。また、新規 MDCK 細胞において A/PR8 株のウイルス増殖性改善による I 型 IFN 産生量への影響を調べた結果、I 型 IFN 産生制御機構と別の経路を介してウイルス産生量が有意に増加した。以上より、ウイルス高増殖性を示す新規 MDCK 細胞の樹立によって効率的なワクチンシードウイルスの分離増殖が可能となり、大量のワクチン供給体制の構築に繋がることが期待される。

A. 研究目的

新型インフルエンザ感染症の予防・制御対策には、有効で安全性の高いワクチンを十分な供給量を確保し、迅速なワクチン生産体制を確立することが最前の戦略である。欧州では細胞培養法によるパンデミックインフルエンザワクチンの承認を取得しており、日本国内においてもワクチン生産能力の向上を図るため、鶏卵培養法から細胞培養法への移行を進めている。細胞培養法によるワクチン製造の大きな利点は従来の鶏卵培養法よりも生産期間が短縮でき、ヒト流行株の抗原性が維持されるため、有効性

が高いワクチンを大量に製造できる。従来の MDCK 細胞では、すべてのウイルス臨床分離株が効率良く増殖するとは限らないため、シードウイルスの分離増殖にはウイルス高増殖性細胞株を使用することが望ましい。そこで本研究の目的は、I) ウイルス感染に応答して引き起こされる I 型インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子群を標的とする siRNA を用いたノックダウン解析により、ウイルス増殖性に関与する宿主因子を同定し、II) 遺伝子改変によるウイルス高増殖性を示す新規 MDCK 細胞を樹立することである。また、新規 MDCK 細胞において、イン

フルエンザウイルス感染時のウイルス産生量を評価し、ウイルス増殖制御機構の解明を目指す。

B. 研究方法

前年度は、78種類のヒトI型IFN誘導性遺伝子群を標的とするsiRNAをA549細胞に導入し、A/PR8株[A/PR/8/34(H1N1)]感染後、培養上清中のウイルスRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてウイルス量を定量した。標的遺伝子をsiRNAでノックダウンした結果、コントロールと比較して高感度かつ再現性良くウイルス産生量を有意に増加させる遺伝子を同定した。MDCK細胞においても同様の実験方法により再現性を確認した。今回同定した遺伝子に対するshRNA安定発現MDCK細胞株を樹立し、A/PR8株感染時のウイルス産生量を測定した。

本年度は、コントロールMDCK細胞と新規MDCK細胞にA/PR8株(A/H1N1)、A/Narita/1/2009株(A/H1N1pdm09)、B/Florida/4/2006株(B/山形系統)、A/Victoria/361/2010株(A/H3N2)感染後、培養上清中のウイルス液のHA価を測定した。さらに、A/PR8株感染後、培養上清中のウイルスRNA及び細胞内RNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてウイルス産生量及びIFN- α / β 産生量を定量し、比較検討した。

C. 研究結果

ヒトI型IFN誘導性遺伝子群を標的とするsiRNAスクリーニングの結果、IRF7をノックダウンするとコントロールに比べて再現性良くウイルス産生量が2~4倍増加した。A549細胞と同様、MDCK細胞においてもIRF7をノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量は約4倍まで増加した。shRNAコントロール細胞とshRNA_IRF7発現細胞にA/PR8株(A/H1N1)、A/Narita/1/2009株(A/H1N1pdm09)、B/Florida/4/2006株(B/

山形系統)、A/Victoria/361/2010株(A/H3N2)感染後、培養上清中のウイルス液のHA価を測定した結果、コントロール細胞と比較して2~8倍増加した。また、A/PR8株感染後、培養上清中のウイルスRNA及び細胞内RNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてウイルス産生量及びIFN- α / β 産生量を定量した結果、ウイルス産生は改善されたが、I型IFN産生能への影響は認められなかった。

D. 考察

本研究では、新型インフルエンザ感染症の予防と制御を目標に、従来のMDCK細胞よりもさらに高い効率でのシードウイルスの分離増殖とワクチン製造を可能とするMDCK細胞の遺伝子改変によるウイルス高増殖性細胞の取得を試みた。その結果、IRF7をノックダウンするとウイルスRNA及びHA蛋白量は増加し、ウイルス産生が改善された。また、ウイルス増殖性の向上によるI型IFN産生量への影響はなかったことから、インフルエンザウイルスの増殖性改善にはI型IFN産生制御機構と別の経路が関与していることが示唆された。今後は、IRF7低発現MDCK細胞においてインフルエンザウイルス産生を改善させる分子機構の解析を進めていくことにより、ウイルス増殖効率が向上する新規ワクチンシード作製候補細胞株の探索及び開発を進めていきたい。従来の細胞に比べてウイルス高増殖性を示す細胞は、低増殖性ウイルスの分離増殖に有用であり、より短期間に大量のワクチン製造が可能になるため、感染拡大防止及び感染制御に結びつくことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N.: High yield production of influenza

virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. PLoS One 8(3): e59892, 2013

2. 学会発表

Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. High yield production of influenza A virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. 4th Influenza Vaccines for the World, Valencia, Spain, October 2012

浜本いつき、原田勇一、中村一哉、高橋仁、許斐奈美、浅沼秀樹、田代真人、山本典生 「無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

原田勇一、高橋 仁、中村一哉、浜本いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐奈美、浅沼秀樹、板村繁之、田代真人、山本典生 「インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

高橋 仁、原田勇一、中村一哉、浜本いつ

き、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村繁之、田代真人、山本典生 「インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

Hamamoto I, Yamamoto N, Tashiro M. High yield production of influenza A virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. United States-Japan Cooperative Medical Science Program, USJCMSP, Singapore, March 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞培養組成物、インフルエンザウイルスの生産方法、インフルエンザウイルスにつき特許出願

特願 2012-93016

(出願日 2012 年 4 月 16 日)

- | | |
|-----------|----|
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
「急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究」
分担研究報告書（平成 24 年度）

小児患者における耐性インフルエンザウイルスに関する研究

研究分担者：中野貴司（川崎医科大学小児科学教授）

研究要旨

2008-09 年流行シーズンの、H1N1（A ソ連型）ウイルス H275Y 変異オセルタミビル耐性ウイルス以降、臨床的に問題となる大規模な耐性ウイルスの出現は報じられていないが、適切なインフルエンザの診療と感染制御を実践するために、耐性ウイルスへの監視は不可欠である。特に小児では、免疫力の未熟さも関与して、耐性インフルエンザウイルス出現の頻度が高いとされる。本分担研究では、2010/11, 2011/12, 2012/13 のインフルエンザ流行期 3 シーズンの小児インフルエンザ患者から、ノイラミニダーゼ阻害薬治療前後で経時的に検体を採取し、ウイルス分離と薬剤感受性の検討を行った。11 ヶ月児から治療後の回復期に分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスは H275Y 変異を有するオセルタミビル耐性ウイルスで、患者からのウイルス排泄は遷延した。本例以外には、現時点で耐性化の問題は発見されていないが、解析を継続中である。

研究協力者：

田中敏博（JA 静岡厚生連静岡厚生病院小児科）、後川 潤、大内正信（川崎医科大学微生物学）、山下 誠（第一三共株式会社生物医学研究所）

A. 研究目的

インフルエンザの診療と感染制御においては、耐性ウイルスへの監視が不可欠である。特に小児患者では、その免疫力の未熟さも関与して、耐性インフルエンザウイルスが出現しやすいといわれている。2008-09 年には、わが国を含めて世界中で分離された H1N1（A ソ連型）ウイルスは、そのほと

んどが H275Y 変異を有するオセルタミビル耐性ウイルスと報告された。2009 年に発生した A(H1N1)pdm09 のパンデミックにおいては、同じ H1N1 亜型ということもあり、耐性ウイルス出現への懸念が論じられた。幸いその後は、臨床的に問題となる大規模な耐性ウイルスの出現は報じられていないが、今後も注意の継続は必要である。効果的なインフルエンザ診療と感染制御の実践に役立てることを目的に、小児患者における耐性ウイルスの出現について検討した。

B. 研究方法

2010/11, 2011/12, 2012/13 のインフル

エンザ流行期 3 シーズンに、発熱や呼吸器症状を主訴として静岡厚生病院小児科を受診し、インフルエンザ感染症を疑われ、迅速検査を実施した小児で、本研究に関して保護者から（年長児では本人からも）同意を取り付けた症例を対象とした。

患児の鼻腔にトラップ付き気管吸引チューブを挿入して鼻汁を吸引し、さらに生理食塩水 2mL を吸引してチューブ内に残存した鼻汁をトラップ内に採取した。本検体を用いて迅速診断検査を実施した後、 -80°C で冷凍保存した。可能な限り、ノイラミニダーゼ阻害薬による治療後、もしくはノイラミニダーゼ阻害薬の投与を行わなかった患者では経過観察後の回復期にも、検体を採取した。保存検体を用いてインフルエンザウイルスの分離と同定を行い、TCID 法でウイルス量 ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) を測定した。さらに、検体の培養細胞への感染により 1 度増殖させたウイルス液を用い、各種ノイラミニダーゼ阻害薬に対する IC_{50} を解析した。NA 配列は検体から抽出した RNA を RT-PCR で増幅し決定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、静岡厚生病院倫理委員会の承認を得た。鼻汁の吸引は、日常診療において培養検査や迅速検査の目的でしばしば実施されるが、最大限に愛護的に実施した。また、患者の個人情報特定されないように十分注意を払い、データを解析した。

C. 研究結果

2010/11 シーズンは、生後 11 ヶ月から 14 歳まで（中央値 8.5 歳）、計 14 症例から鼻汁検体を採取した。亜型別では、A(H1N1)pdm09 : 7 例、A(H3N2) : 1 例、B 型 : 6 例であった。本シーズンの最年少症例（11 ヶ月児）では、発症後 8 日目、ペ

ラミビル治療後 4 日目でも A(H1N1)pdm09 亜型ウイルスが分離陽性であった。治療前に採取した検体の各種ノイラミニダーゼ阻害薬に対する IC_{50} は、オセルタミビル 1.03nM、ペラミビル 0.447 nM、ザナミビル 0.990 nM、ラニナミビル 0.930 nM であった。治療後に採取した検体の IC_{50} は、オセルタミビル 84.9nM、ペラミビル 12.7 nM、ザナミビル 0.775 nM、ラニナミビル 1.10 nM であった。本児からは H275Y 変異を有するオセルタミビル耐性ウイルスが分離された。

本症例以外に、治療前後の検体を採取することが出来て、A(H1N1)pdm09 が分離された症例が 3 例あったが、 IC_{50} はオセルタミビル 0.374-1.26nM、ペラミビル 0.146-0.464 nM、ザナミビル 0.409-1.057 nM、ラニナミビル 0.384-0.921 nM の範囲で、治療前後で有意な差異は無かった。

2011/12 シーズンは、1 歳から 13 歳まで（中央値 5.5 歳）、計 36 症例から鼻汁検体を採取した。亜型別では、A(H3N2) : 28 例、B 型 : 8 例（Victoria 系統 : 5 例、Yamagata 系統 : 3 例）で、A(H1N1)pdm09 は分離されなかった。A(H3N2) が分離された 28 例の治療前の検体を用いた各種ノイラミニダーゼ阻害薬に対する IC_{50} は、4 剤いずれについても 1.0nM 未満であった。このうち 20 例で回復期の検体からもウイルスが分離されたが、 IC_{50} 値の有意な変化は認められず、ノイラミニダーゼ阻害薬を投与した 14 例としなかった 6 例の間でも有意な差はなかった。B 型について、8 例の治療前の検体における各種ノイラミニダーゼ阻害薬に対する IC_{50} は、オセルタミビル 13.26-28.81nM、ペラミビル 1.17-3.17 nM、ザナミビル 2.82-4.70 nM、ラニナミビル 3.30-4.97 nM の範囲であった。Victoria 系統と Yamagata 系統の各 1 例（いずれもノイラミニダーゼ阻害薬の

投与なし) で回復期にもウイルスが分離されたが、IC₅₀ 値の有意な変化は認められなかった。

2012/13 シーズンについては、迅速検査陽性であった鼻汁検体のウイルス分離を実施中である。

D. 考察

2010/11 シーズンに、11 ヶ月児から H275Y 変異を有する耐性ウイルスが分離された。本症例では、治療薬としてペラミビルが用いられていた。IC₅₀ 検討の結果では、オセルタミビル以外にペラミビルにも交叉耐性を呈した。ただし、ペラミビルに対する耐性の程度はオセルタミビルほど高度ではなかった。一方、ザナミビルとラニナミビルには感受性であった。本結果は、H275Y 変異を有する耐性ウイルスの感受性結果に合致していた。

本症例では、感受性ウイルスが分離された他の症例よりもウイルスの排泄期間は遷延した。本症例は 11 ヶ月乳児という低年齢であり、免疫能が未成熟なためにウイルスの体内での増殖が遷延した可能性がある。もともと耐性ウイルスの感染し、その増殖が遷延したのか、体内にウイルスが長期間とどまることにより耐性を獲得したのか、今後耐性ウイルス出現の機序を検討する糸口にしたい。いずれにしても、耐性ウイルスは患者からの排泄が長引くことが想定され、耐性ウイルスの監視、感染制御策を考える際に留意が必要である。

現在、耐性ウイルスが分離された症例について詳細な検討を進めるとともに、その後の 2 流行シーズンに分離されたインフルエンザウイルスに関して引き続き解析を実施中である。

E. 結論

ウイルス排泄期間が遷延することの多い小児では、特に耐性ウイルスに対する監視が重要である。インフルエンザは各流行シーズンで分離されるウイルス亜型が異なるため、臨床検体を用いる場合は一貫した流れでの研究が継続できないという課題はあるが、今後のインフルエンザ診療と感染制御に活用できる研究を継続したい。

F. 研究発表

(論文発表)

1. 高橋裕明, 矢野拓弥, 福田美和, 山内昭則, 大熊和行, 庵原俊昭, 中野貴司, 松田正, 鳥越貞義, 二井立恵, 伊佐地真知子, 渡辺正博, 落合仁, 酒徳浩之, 加藤孝, 前田一洋, 奥野良信, 神谷齊: 小児におけるインフルエンザ HA ワクチン接種量変更による効果と安全性の検討. 感染症誌. 2013 : 87 (2) : 195-206.

2. Takashi Nakano, Akihisa Okumura, Takuya Tanabe, Shimpei Niwa, Masato Fukushima, Rie Yonemochi, Hisano Eda, Hiroyuki Tsutsumi. Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance. Scand J Infect Dis. 2013:Early online publishing.

(学会発表)

1. 田中敏博、中野貴司、他. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2012 年 11 月 24~25 日). 抗インフルエンザ薬による治療と鼻汁吸引液中のインフルエンザウイルス:2011/2012 シーズンの調査研究より. 2012 年 11 月 24 日. 北九州.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

2008-2009 年, 2009-2010 年, 2011-2011 年, 2011-12 年
シーズンにレバノン・ベイルート市で流行した
インフルエンザウイルスの分子疫学的解析

研究分担者 齋藤玲子 新潟大学医歯学総合研究科国際保健学分野（公衆衛生）・教授

研究分担者 鈴木宏 新潟青陵大学看護福祉学部・教授

研究協力者 クライド・ダパット、齋藤孔良、近藤大貴、鈴木康司（新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野）

ハッサン・ザラケット（セントジュードメディカルセンター病院・米国）、キャレル・タベット、ミレーユ・レティーフ、ガッサン・ドバイボ（アメリカン・ベイルート大学・レバノン）

研究要旨

レバノンの首都ベイルートにおいて、2008-2009 年、インフルエンザウイルス A 型（H1N1pdm）によるパンデミック期 2009-2010 年、パンデミック以降の時期（2010-2011 年及び 2011-12 年）の 4 シーズンにおいて流行したインフルエンザウイルスの分子疫学的特徴の解明と、薬剤耐性ウイルスの発生動向を調査した。レバノンでは、季節性インフルエンザ流行は冬季であり、H1N1pdm09 の流行は 2009 年の 6 月及び 10 月から 11 月であった。また、各型、亜型の流行はヨーロッパと類似していた。また、系統樹解析によりレバノンで分離された株はその他中東諸国とヨーロッパ、アジアの株と近縁であることが明らかになった。薬剤耐性ウイルスに関しては、2008-2009 年シーズンにおいて世界的に流行した季節性オセルタミビル耐性 H1N1 の比較的小規模な流行と、2009-2010 年と 2010-2011 年シーズンに地域レベルの限定的なオセルタミビル耐性 H1N1pdm09 の発生が認められた。

A. 研究目的

本研究は、レバノンの首都ベイルートにおいて、オセルタミビル（タミフル）耐性インフルエンザの世界的流行期（2008-2009 年）、インフルエンザウイルス A 型（H1N1pdm）によるパンデミック期（2009-2010 年）、パンデミック以降の時期（2010-2011 年及び 2011-12 年）の 4 シーズンにおいて流行したインフルエンザウイルスの分子疫学的特徴の解明と、薬剤耐性ウイルスの発生動向を調査することを目的とした。

B. 研究方法

2008-2009 年、2009-2010 年、2010-2011 年、2011-12 年の 4 シーズンにおいてベイルート市のアメリカンベイルート大学外来を受診したインフルエンザ様疾患を呈する外来患者から鼻咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルス A, B 迅速診断キットによるスクリーニングを行った。その後、迅速診断キット陽性検体を新潟大学に輸送し、MDCK 細胞にてウイルス分離を行い、培養検体から RNA を抽出し、cDNA 合成を行いリアルタイム PCR で型・亜型判定を行った。流行ウイルス株の特徴は、ヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）遺伝子配列をシーク

エンスし、ウイルス系樹解析により分析した。また、分離培養された各型・亜型ウイルス株選択した株で、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルに対して NA 阻害剤感受性検査を行った。

(倫理面への配慮)

本調査においては、アメリカンベイルート大学医学部倫理委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

2008-2009 年シーズンは、分離培養された全 40 株のうち、A 香港型 H3N2 (以下 A/H3N2) が 33 件でほとんどを占め、次いでインフルエンザ B 型が 4 件、A ソ連型 H1N1 (以下 A/H1N1) が 3 件であった。2009-2010 年シーズンは、全 30 件がパンデミックインフルエンザ A 型 (H1N1pdm09) で占められ、その後の 2010-2011 年シーズンは全 21 件中 H1N1pdm09 が 10 件とインフルエンザ B 型が 11 件で、2011-2012 年シーズンは、全 28 件中 A/H3N2 が 25 件とほとんどを占め、残り 3 件が H1N1pdm09 であった (図)。

ヘマグルチニン (HA) 遺伝子配列の系統樹解析により、A/H1N1pdm09、A/H3N2、インフルエンザ B 型の遺伝子進化について解析した。A/H1N1pdm は、2009 年にワクチン株 California/7/2009 に類似したクラスター 1 と、New York/10/2009 株に類似し、日本では 2009 年後期に流行したクラスター 2 に分岐した。2010-2011 年シーズンにはクラスター 5, 6, 7 に進化したが、2011-12 年はクラスター 6 のみが検出された。A/H3N2 は、2008-2009 年シーズンの流行株全てがワクチン株 Brisbane/10/2007 と同じクラスターに属していたが、レバノンの株同士で地域的なクラスタリングを形成していた様であった。その後 2009-2010 年、2010-2011 年シーズンは A/H3N2 は検出されず、2011-2012 年はワクチン株 Victoria/361/2008 と類似の株が日本及び

ヨーロッパと同様に流行した。日本ではクレード 3B, 3C が分離されたが、レバノンでは 3B のみが分離された。また、レバノンで流行した A/H3N2 はその他の中東諸国で流行した株と類似していた。インフルエンザ B 型は、2009 年に分離された 3 株は山形系統でクレード 3 に属しており、1 株のみがワクチン株 Brisbane/60/2008 に類似のビクトリア系統であった。両系統の比率は、山形系統 75%、ビクトリア系統 25%と、ヨーロッパにおける山形系統 70%、ビクトリア系統 30%の比率と近かった。2010-2011 年シーズンでは、ワクチン株 Brisbane/60/2008 に類似したビクトリア系統の株のみが分離された。

薬剤耐性ウイルスに関しては、2008-2009 年シーズンに分離された 3 株の季節性 A/H1N1 は全て H275Y 変異をもったオセルタミビル耐性であり、平均で 828.1 ± 84.1 nM の IC_{50} 値を示した。2009-2010 年シーズンでは、H1N1pd09m の 1 株が H275Y 変異をもつオセルタミビル耐性ウイルスでありオセルタミビルに対し約 400nM の IC_{50} 値を示した。しかし、この耐性株が採取された患者には薬剤投与歴はなかった。2010-2011 年シーズンでは、1 株がオセルタミビルに対し 4nM と軽度の感受性低下を示した。この感受性低下株はノイラミニダーゼ遺伝子に S247N, N385T, N386K の 3 つのアミノ酸変異を認めた。そのうち S247N は、H5N1 と H1N1pdm09 で既に報告されており、H275Y 変異と合わさるとオセルタミビルの IC_{50} が 6000 倍にも上昇することが明らかになっている。2011-2012 年シーズンでは、H1N1pdm09 は全て薬剤感受性であった。また、これまでの調査において A/H3N2 とインフルエンザ B 型では薬剤感受性低下株は認められなかった。

D. 考察

インフルエンザウイルスの各型、亜型の

流行パターンは他の中東諸国及びヨーロッパと良く類似しており、更にヘマグルチニン(HA)遺伝子配列の系統樹解析により、レバノンで分離された A/H1N1pdm09、A/H3N2、インフルエンザ B 型株が他の中東諸国やヨーロッパ、そしてミャンマー、日本などのアジアと同じクラスターに位置していたことから、系統樹解析によりレバノンで分離された株がその他の中東諸国とヨーロッパで分離された株、そしておそらくアジアの株と近縁であることが明らかになった。しかしその一方で、2008-2009 年では世界的に季節性オセルタミビル耐性 H1N1 が流行し、日本やヨーロッパでも大流行していたにも関わらず、レバノンでは分離された株のわずか 10%に過ぎなかった。これは、レバノンでのインフルエンザ各型、亜型の流行パターンがほとんどのシーズンで流行株のパターンがヨーロッパと似ていることと相反しており興味深い、原因は不明である。

薬剤耐性ウイルスに関しては、2008-2009 年シーズンにおいて世界的に流行した季節性オセルタミビル耐性 H1N1 の限定的な流行 (A/H3N2 の約 1/10 の件数) 以外は 2009 年に H1N1pdm09 で H275Y 変異を持つ株が 30 件中 1 件 (3%) と分離されたのみであったことから、限定的な地域レベルでの流行にとどまっていたと考えられる。翌シーズンの 2010-2011 年シーズンには、H275Y 変異と合わさるとオセルタミビルの IC50 が 6000 倍にも上昇することが明らかになっている S247N が H1N1pdm09 で 10 件中 1 件 (10%) 検出されている。従って、今回のサーベイランスでは検出されなかったが、H274Y 変異と S247N 変異を併せ持ったウイルスも存在していた可能性も考えられる。

E. 結論

レバノンでは、季節性インフルエンザ流行は冬季であった。また、H1N1pdm09 の流行は 2009 年の 6 月及び 10 月から 11 月であった。また、各型、亜型の流行はヨーロッパと類似していた。また、系統樹解析によりレバノンで分離された株がその他の中東諸国とヨーロッパで分離された株、そしておそらくアジアの株と近縁であることが明らかになった。薬剤耐性ウイルスに関しては、2008-2009 年シーズンにおいて世界的に流行した季節性オセルタミビル耐性 H1N1 の限定的な流行と、地域レベルで 2009 年と 2010-2011 年シーズンにそれぞれ H275Y 変異と S247N 変異をもつ H1N1pdm09 が分離されたのみであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zaraket H, Kondo H, Tabet C, Hanna-Wakim R, Suzuki Y, Dbaibo GS, Saito R, Suzuki H. Genetic diversity and antiviral drug resistance of pandemic H1N1 2009 in Lebanon. *J Clin Virol.* 51(3):170-4, 2011.

邦文

なし

2. 学会発表

なし

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