

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月に、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開始した。2010/11シーズンからは、オセルタミビルとザナミビルに加えて、新規抗インフルエンザ薬ペラミビル（商品名ラピアクタ）およびラニナミビル（商品名イナビル）を含む計4種類の薬剤について耐性株サーベイランスを実施している。2011/12シーズンは、国内の流行の主流がA(H3N2)およびB型ウイルスで、A(H1N1)pdm09ウイルスの流行はほとんどみられず、全国での分離・検出報告数はわずか15例であった。そこで2011/12シーズンは、A(H3N2)およびB型ウイルスに対する耐性株サーベイランス体制の強化を図った。

## B. 研究方法

2011/12シーズンのA(H1N1)pdm09分離株について、昨年度の本研究の成果に基づき、MUNANA基質を用いた蛍光法によって、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実施し、IC50値を算出した。また、2011/12シーズンのA(H3N2)およびB型分離株のうち、感染症サーベイランスシステム（NESID）登録株の約5-15%をコンピュータでランダムに選択して、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。さらに、NA遺伝子解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

## C. 研究結果

2011/12シーズンには、A(H1N1)pdm09分離株9株を解析した結果、耐性株は検出されなかった。流行の主流を占めるA(H3N2)分離株は290株、B型分離株は263株について、

解析を行った。その結果、オセルタミビルおよびペラミビルに対して交叉耐性を示すA(H3N2)ウイルス1株がオセルタミビルの予防投与例から検出された。この株のNA遺伝子を解析したところ、既知の耐性マーカーであるR292K変異をもつことが明らかになった。B型分離株はすべての薬剤に対して感受性を示し、耐性株は検出されなかった。

## D. 考察

昨年度までの本研究の結果から、A(H1N1)pdm09ウイルスの耐性株検出率は2008/09シーズンには0.5%、2009/10シーズンは1.1%、2010/11シーズンは2.0%と、わずかながら上昇の傾向が認められていた。しかし、2011/12シーズンには、耐性株は1株も検出されなかった。これは、2011/12シーズンは流行の主流がA(H3N2)およびB型ウイルスで、A(H1N1)pdm09ウイルスの解析株数がわずか9株であったことが影響している可能性が高い。2012/13シーズン半ばの途中経過では、A(H1N1)pdm09ウイルスの分離・検出報告数はすでに昨シーズンの全報告数を上回っている。さらに欧州および中国では、流行の主流が再びA(H1N1)pdm09ウイルスに戻っており、日本国内でも引き続き、A(H1N1)pdm09ウイルスについて薬剤耐性株の発生状況を監視していく必要がある。一方、A(H3N2)ウイルスでは、オセルタミビル・ペラミビル交叉耐性株が1株検出された。この耐性株はオセルタミビルの予防投与例から検出され、地域への拡大は確認されていないが、今後も注意深く監視を続ける必要がある。

## E. 結論

抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの監視にあたっては、A(H1N1)pdm09ウイルスの

みならず、A(H3N2)およびB型ウイルスに関しても、薬剤耐性株の発生状況について継続的な監視を行う必要性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

N.Kishida, S.Fujisaki, M.Yokoyama, H.Sato, R.Saito, H.Ikematsu, H.Xu, E.Takashita, M.Tashiro, S.Takao, T.Yano, T.Suga, C.Kawakami, M.Yamamoto, K.Kajiyama, H.Saito, S.Shimada, S.Watanabe, S.Aoki, K.Taira, M.Kon, JH. Lin and T.Odagiri. Evaluation of Influenza Virus A/H3N2 and B Vaccines on the Basis of Cross-Reactivity of Postvaccination Human Serum Antibodies against Influenza Viruses A/H3N2 and B Isolated in MDCK Cells and Embryonated Hen Eggs. *Clinical and vaccine immunology*, 19,897-908,2012.

S.Fujisaki, E.Takashita, M.Yokoyama, T.Taniwaki, H.Xu, N.Kishida, H.Sato, M.Tashiro, M.Imai and T.Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 429,51-56,2012.

E.Takashita, Y.Muraki, K.Sugawara, H.Asao, H.Nishimura, K.Suzuki, T.Tsuji, S.Hongo, Y.Ohara, Y.Kawaoka, M.Ozawa and Y.Matsuzaki. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. *Journal of Virology*, 86,13108-13111,2012

### 2. 学会発表

江島美穂、高下恵美、藤崎誠一郎、金南季、佐藤彩、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、今井正樹、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：3シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスサーベイランス 第26回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2012年5月

川上千春、七種美和子、江島美穂、高下恵美：長期持続感染例のウイルス変異 第26回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2012年5月

E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, N.Kim, A.Sato, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, M.Tashiro and T.Odagiri : Detection of antiviral-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Japan by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays. 3rd International Influenza Meeting 2012, September 2012

E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, N.Kim, A.Sato, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, M.Tashiro and T.Odagiri : Detection of Antiviral-resistant Influenza Viruses in Japan from 2008-2009 to 2011-2012 Influenza Seasons. 2nd isirv Antiviral Group Conference, Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 2012

藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人：新しい薬剤耐性変異を持つB型インフルエンザウイルスの性状 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月

高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：3シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月

岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2011/12シーズンのインフルエンザ流行株と平成24年度のワクチン株 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月

川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代真人：免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄されたA (H3N2) インフルエンザウイルスの解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月

小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人：孵化鶏卵分離、馴化にともなうインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月

高下恵美：新規抗インフルエンザ薬に対する耐性ウイルス検出系の構築 第2回 Negative Strand Virus-Japan、2013年1月

小田切孝人、岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、田代真人：インフルエンザワクチン株の卵馴化による2012/13シーズンワクチンの効果におよぼす影響およびブタ由来A/H3N2 variant(v) ウイルスに対する邦人の抗体

保有状況 第2回 Negative Strand Virus-Japan、2013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）

### 研究要旨

本研究では、変異型インフルエンザウイルスの蛋白質立体構造情報を迅速に提供することを主目的とし、サーベイランスと連携してウイルスのリスク評価やインフルエンザ対策に役立てることをめざした。任意の変異型蛋白質の構造情報を迅速に取得するために、計算科学の技術を応用する解析プラットフォームの構築を進めた。最終年度は、研究代表者らと共同で HA, NA 蛋白質の研究成果を論文として公表した。成果を広く同業者に発信してインフルエンザ対策研究の推進に役立てた。さらに解析プラットフォームの質の向上を目的として、新たに分子動力学法を実行する解析環境の構築を進めた。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルス（IFV）感染症の制御は、国際社会の主要課題と位置づけられる。IFV は高度に変異性で、形や性質を速やかに変えて新興再興感染症を発生させる。このため、まずサーベイランス体制を強化し、ウイルスのリスクを高める遺伝子変異の発生と拡大を監視することが重要となる。その際、未報告の特徴的な遺伝子変異が特定された時には、その変異がウイルスの性質（抗原性、薬剤感受性、宿主指向性など）に及ぼす影響を迅速に把握することが重要となる。ウイルス蛋白質の立体構造情報は、変異型ウイルスの性質変化の検討、さらには血清学的検査やワクチン・薬剤の有効性の検討に有用である。リスク評価やインフルエンザ対策を科学的に進める際に必要な基盤情報の一つとなる。

しかし、一般に、実験のみで蛋白質構造情報を取得するには時間がかかり、リスク評価の際に求められる迅速性を保つことは極めて難しい。緊急時には後手に回る可能性が高い。そこで我々は、計算

機を駆使して科学上の問題を解決する計算科学（Computational Science）の諸技術に着目した。計算科学は、実験/観測と理論の間を補間する第三の科学形態として急速に進展し、広範な分野で応用が進んでいる。計算科学的アプローチにより、実験では難しい事象の解析が可能となる。また、解析内容によっては迅速性も担保される。我々は、この技術を HIV の解析に応用し、易変異性ウイルスの速やかな構造解析に極めて有効であることを示してきた。そこで本研究では、この技術を IFV の構造解析に拡張し、特に問題となりうる変異ウイルスについて蛋白質の構造情報を提供することとした。

過去 2 年間の分担研究では、ホモロジーモデリング法を IFV エンベロープ蛋白質の構造予測に応用する基盤を作り、A 型 B 型の HA 及び NA 蛋白質の野生型と変異型の機能構造（多量体）を予測した。この構造情報を、1) 2009-11 年に富山県で流行したパンデミックウイルス A (H1N1)pdm の赤血球凝集活性低下のしくみ、2) 2009 年 A 香港型と B 型ワクチン原

株の鶏卵培養による抗原性変化のしくみ、及び3) 2011年B型ヴィクトリア系統株の新規変異による薬剤耐性発現のしくみ、などの解明に役立てた。

最終年度は、研究成果の論文化と新たな解析手法の基盤作りを進めた。NA蛋白質四量体の立体構造について、構造の安定性についての追加解析を行うことで、論文化に必要な情報を取得した。研究代表者と共同でこれらの成果を論文とし、広く同業者に情報を発信した。また、ホモロジーモデリング法による構造解析を補完するとともに、機能的構造変化の解析を可能とする系を作ることを目的として、新たに分子動力学法の解析基盤の構築を進めた[1]。

## Reference

[1] Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in Microbiology*. 3:258, 2012.

## B. 研究方法

### 1. 解析対象蛋白質

2011年B型ヴィクトリア系統の薬剤感受性株と耐性株のNA蛋白質四量体を解析対象とした。

### 2. 分子モデリング

NA蛋白質の機能構造モデル(四量体構造)は、ホモロジーモデリング法[1]により構築した。モデリングには、MOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) [2]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[2]。モデリングの鋳型としては、X線結晶構造を用いた。PDB ID:3K39 解像度 2.54 Å [3]。

### 3. 結合エネルギー計算

NA蛋白質四量体の結合エネルギーは、MOEを用い、既報の方法に従い、以下の式

を用いて算出した[3]。

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{tetramer}} - E_{\text{monomer}} \times 4$$

## 4. 分子動力学計算

薬剤感受性株のNA蛋白質、及び同じ蛋白質にE105K変異を導入した薬剤耐性株のNA蛋白質の分子モデルをホモロジーモデリング法で構築し、分子動力学解析の初期構造とした。Amber 9 program package[4]を用いて、分子動力学法により水溶液中の蛋白質の構造動態を追跡した。

## References

[1] *Science* 294: 93-96, 2001.

[2] MOE. <http://www.chemcomp.com/>

[3] *J. Med. Chem.* 53: 6421-6431, 2010.

[4] AMBER 9. University of California: San Francisco., 2006. <http://ambermd.org/>

(倫理面への配慮) 該当事項は無い。

## C. 研究結果

### 1. HA, NA蛋白質研究の成果の論文化

以下の課題について、必要に応じて追加解析を行いながら、研究代表者らと共同で論文を作成し、広く同業者に情報を発信した。(F. 研究発表 論文発表 1-3 参照)

(1) 2009-2011年に富山県で流行したパンデミックインフルエンザウイルス A (H1N1)pdm のHA蛋白質三量体の構造解析(図1)

構造モデリングにより、2009-11年に富山県で流行したパンデミックウイルス A (H1N1)pd 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(図1)。これらの流行株は、受容体特異性や親和性が変化している可能性がある。この構造レベルで示唆される可能性は、A197T変異をもつ2009-2011年流行株の赤血球凝集活性が低いという実験的知見と一貫性がある。(F. 論文発表 1 参照)

(2) 2009年A香港型とB型のワクチン原

株・変異株の HA 蛋白質の構造解析 (図 2)

構造モデリングにより、A/H3N2 型と B 型のいずれも、鶏卵培養後に HA の感染受容体結合ポケット周辺、すなわち主要中和エピトープ領域に変異が生じたことがわかった (図 2)。これにより、A/H3N2 型ではポケット近傍の形状や生化学的性質の変化、B 型では糖鎖の欠落によるポケット近傍の立体障害の消失がおきうると推測された。2009 年 A 香港型と B 型のワクチン原株は、受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して鶏卵指向性を増強した一方、その適応変異は HA の抗原性を変えた、と推察される。近年のワクチン原株は、鶏卵培養により抗原性が変化するリスクがあることがわかった。(F. 論文発表 2 参照)

(3) 2011 年 B 型ヴィクトリア系統の薬剤感受性株と耐性株の NA 蛋白質四量体の構造解析

2011 年の B 型ヴィクトリア系統

近年の B 型ヴィクトリア系統株の薬剤耐性と連動する 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。

最終年度はこれらの点について、さらに検討した。モデルの詳細な検討より、E105 は隣接する NA 分子との境界面に位置するアミノ酸残基 G141 との間に水素結合を形成することを見出した。隣接する NA 分子間の結合エネルギーを求めたところ、493 kcal/mol (薬剤感受性株) から 481 kcal/mol (E105 薬剤耐性株) に減少するとの結果を得た。上の「E105K 変異は四量体構造の安定性の変化を惹起しうる位置に配置する」との予測を支持する結果を得た。(F. 論文発表 3 参照)

2. 分子動力学解析の実施環境の構築

上の (3) の研究により、2011 年 B 型ヴィクトリア系統の株は、薬剤結合部位から離れた場所に生じる変異で薬剤耐性を獲得することがわかった。また、変異の位置から、耐性発現機構について幾つかの可能性が推察された。これらの可能性を検証するために、分子動力学解析の実施を計画した。この手法のウイルス研究への応用法を調査し [1]、分子動力学を実行する環境 (ハードとソフト) を整備した。薬剤感受性・耐性株の NA 蛋白質で計算を開始したが、研究年度内に終了しなかった。

## Referenc

[1] Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in Microbiology*. 3:258, 2012.

## D. 考察

(1) 主要成果：最終年度は、研究成果の論文化と新たな解析手法の基盤作りを進めた。研究代表者らの進めた研究について、ホモロジーモデリング法により HA 及び NA 蛋白質の野生型と変異型の機能構造 (多量体) を予測し、1) 2009-11 年に富山県で流行したパンデミックウイルス A (H1N1)pdm の赤血球凝集活性低下のしくみ、2) 2009 年 A 香港型と B 型ワクチン原株の鶏卵培養による抗原性変化のしくみ、及び 3) 2011 年 B 型ヴィクトリア系統株の新規変異による薬剤耐性発現のしくみ、などの解明に役立てた。いずれも、論文として公表された。広く同業者に情報を発信することでインフルエンザ対策研究の推進に役立てた。

(2) ホモロジーモデリング法：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て、未報告の蛋白質分子モデルを構築する方法である [1]。鋳型となる蛋白質と解析対象蛋白質のホモロジーが 90% 程度あれば、X 線結晶構造解析と同程度の

精度 ( $\sim 2\text{\AA}$ ) をもつ高精度モデルを構築できる[1]。一方、モデリングには実験的に得られた立体構造情報を必要とする点、解析上の制約がある。現時点ではアミノ酸配列から蛋白質の折り畳みを予測する技術は確立していないため、モデリングの鑄型の有無が解析可能か否かを定める。

この点、IFV の HA, NA 蛋白質については、鑄型となる結晶構造が充実している。すなわち、IFV A, B 型の HA, NA 蛋白質については、任意のウイルス変異株の蛋白質について、高精度の分子モデルが得られる。ホモロジーモデリング法で構築される分子モデルは、変異蛋白質の折り畳みや変異の立体配置について貴重な情報を提供する。それらの情報を基に、既知の生物情報を取り入れることで、変異の生物学的影響を考察することができる。このように、この手法は、今後の研究においても、変異型インフルエンザウイルスの性状変化の解析に有用と考えている。

課題：一方で、本研究により、研究代表者が求める“機能的構造変化”の解明にはホモロジーモデリング法のみでは不十分であることもわかった。今回、同手法で得られた変異株のモデル構造を野生株のものと比較したところ、ペプチド主鎖に顕著な変化は検出されなかった。この結果は、これらの変異は蛋白質の折り畳みそのものにはあまり影響しないことを示唆する。その一方で、それではこれらの変異がどのようにしてウイルス蛋白質の性質を変えたのか、という点については未解決課題として残された。

(4) 課題の克服にむけて-分子動力学法：ホモロジーモデリング法では検出し得ない構造変化を明らかにする手法として我々が最も注目している技術は、分子動力学法である。蛋白質は、水溶液中では溶質との衝突や自身の熱運動で常に揺らいでいることが知られている。特に、分子表面のループ領域の揺らぎは大きく、このため X 線結晶構造解析ではしばしば表面のループ構造が欠落する。蛋白質表

面の揺らぎは、他分子との特異的な結合と解離を通じて多彩な生理機能を発現するために非常に重要な性質とされる。近年の酵素等の研究から、特にループ領域の揺らぎが蛋白質の特異的相互作用能の維持、ひいては機能の発現に必須であることがわかってきている。もし変異によりループ領域の揺らぎが変化すれば、相互作用表面のエントロピー変化を通じて基質や抗ウイルス因子(抗体や薬剤)の親和性の変化に結びつく。したがって、変異分子の機能的構造変化を理解するためには、蛋白質表面の動的構造の情報を得ることが必須と考えている。

水溶液中での蛋白質構造は極めて短時間( $f$  秒 $\sim$ )で揺らいでいると推定されており、その詳細を実験的に解析することは非常に難しい。また、静止状態での折り畳みと安定構造を探索するホモロジーモデリング法では解析できない。別種の解析法を必要とする。そこで我々が着目し、応用研究を重ねているのが分子動力学法(Molecular Dynamics: MD)である。この技術は、近年、蛋白質科学・計算科学の境界分野で急速に進展している。これを用いると、水溶液中の生体高分子の構造動態を近似できる。MD法はすでにHIVの薬剤・抗体耐性機構の解明に実績がある[1]。また、ウイルス酵素の構造機能研究、ウイルス粒子構造の研究、薬剤開発などへの応用が進んでいる[1]。我々も、これまでに、MD法を用いてHIVの蛋白質の機能発現や薬剤・抗体逃避を可能とする構造特性を明らかにした[1]。

そこで今後は、ホモロジーモデリング法による分子モデリング技術(静止構造の取得)に加えて、MD法の技術(動的構造の解明)を取り入れた解析基盤を構築していきたい。まずは、本研究で見出された薬剤耐性NA蛋白質をモデル分子として、薬剤耐性発現機構を解明するための技術基盤を作りたい。本研究により、B型IFVのNA蛋白質では、薬剤結合部位から遠く離れた箇所に生じる未報告のアミノ酸置換により多剤耐性が発現すること

が判明した。しかし耐性発現の分子機序はまだ完全にはわかっていない。そこで今後は、分子動力学法を取り入れて溶液中での対象蛋白質の構造動態を解析し、変異による薬剤結合部位の動的構造の変化を明らかにすることで、薬剤耐性発現機構を解明していきたい。

## E. 結論

研究代表者らと共同で、IFV サーベイランスに蛋白質立体構造情報を活用する解析プラットフォームの構築を進めた。ホモロジーモデリング法により任意の変異型 IFV について比較的短期間でエンベロープ蛋白質多量体の立体構造情報を予測する環境を作った。構造情報に生物学的情報を取り入れることで、変異のリスクを構造レベルで考察することが可能となった。一方、本研究で構築した構造解析環境にはまだ不十分な点もあることも判明した。そこで分子動力学法を取り入れた新たな解析手法の研究を進めて解析系の向上を計る。これにより、より高品質の立体構造情報を提供する解析プラットフォームをつくり、ウイルスのリスク評価やインフルエンザ対策研究に役立てていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009-2011 influenza seasons. Obuchi M, Yokoyama M, Horimoto E, Obara M, Iwai M, Sato H, Sata T, Takizawa T. *Jpn J Infect Dis*. 64(5):448-50, 2011.
- 2) Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to the reduced susceptibility to multiple neuraminidase inhibitor drugs.

Biochemical and Biophysical Research Communications, in press.

- 3) Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T. Evaluation of influenza A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of post-vaccination human serum antibodies against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clinical and Vaccine Immunology* 19:897-908, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) 高下 恵美、江島 美穂、藤崎 誠一郎、金 南希、岸田 典子、徐 紅、菅原 裕美、伊東 玲子、土井 輝子、本村 和嗣、佐藤 彩、佐藤 裕徳、氏家 誠、小渕 正次、田代 真人、小田切 孝人、全国 地方衛生研究所：2009/10 シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性 pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 2010 年 11 月 7-9 日 (日-火)、東京.
- 2) 岸田 典子、徐 紅、高下 恵美、藤崎 誠一郎、菅原 裕美、伊東 玲子、土井 輝子、江島 美穂、金 南希、本村 和嗣、佐藤 彩、佐藤 裕徳、網 康至、須崎 百合子、小口 晃央、山崎 秀司、藤田 信之、小渕 正次、氏家 誠、田代 真人、小田切 孝人、全国地方衛生研究所：2009/10 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 22 年度のワクチン株. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 2010 年 11 月 7-9 日 (日-火)、東京.
- 3) 小渕正次、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

- 4) 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。
- 5) 藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人：新しい薬剤耐性変異を持つB型インフルエンザウイルスの性状。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日(火-木)、大阪。

#### 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

(参考図)

図1. 赤血球凝集活性低下が示唆された A (H1N1) 2009 株 (A/Toyama/26/2011) の HA1 蛋白質三量体モデル  
感染受容体結合部位近傍にアミノ酸置換 (A197T) が生じていた  
(*Jpn J Infect Dis.* 64:448-50, 2011)

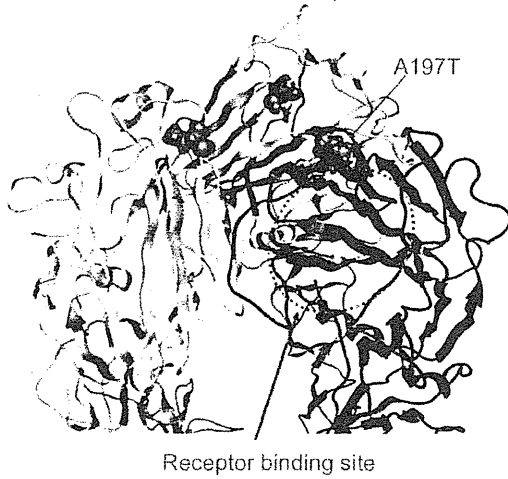


図2. 鶏卵馴化による抗原性の変化が示唆された A 型、B 型ワクチン株の HA 蛋白質構造モデル

A. A/Victoria/210/2009 株 HA (右: 鶏卵培養株 = 感染受容体結合部位近傍にアミノ酸置換 (S228T) が生じている、左: ワクチン原株)

B. Brisbane/60 E4/E4 株 HA (右: ワクチン原株、左: 鶏卵培養株 = 糖鎖付加部位が消失)

(*Clinical and Vaccine Immunology* 19:897-908, 2012)

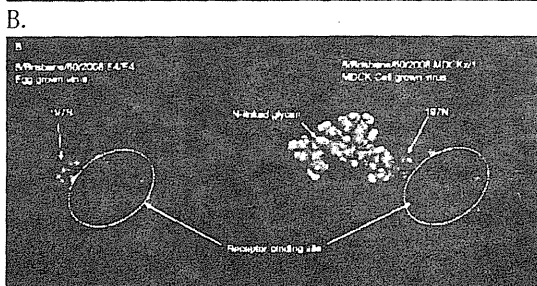
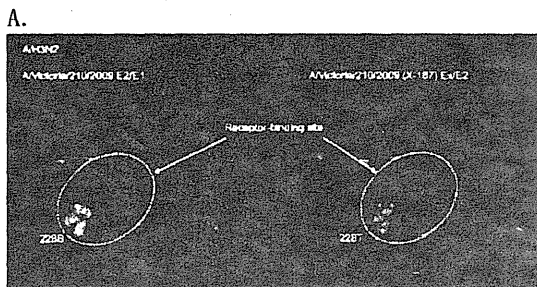
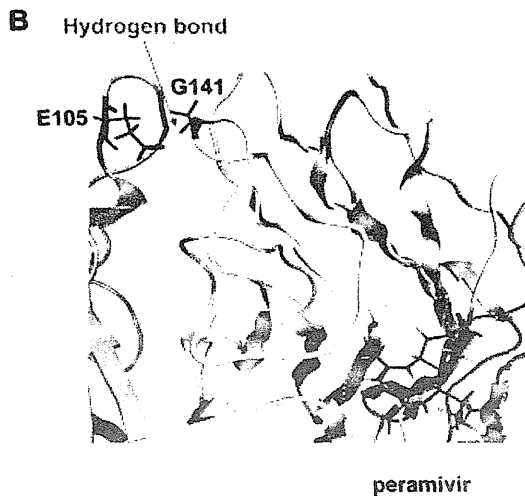
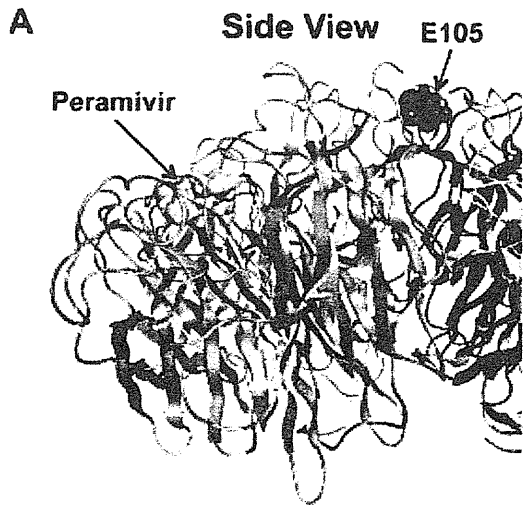


図3. Peramivir が結合した 2011 年 B 型 ヴィクトリア系統株の NA 蛋白質四量体モデル

A. 薬剤感受性株モデル. 薬剤耐性株では、NA 単量体が会合する境界面に位置するアミノ酸 (E105) にアミノ酸置換 (E105K) が生じていた

B. E105 は隣接する NA 分子の G141 と水素結合を形成していた。薬剤耐性株では、この結合が消失していた。



## 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  
研究協力者 小口晃央、花巻朝子、山崎秀司（同上）

### 研究要旨

2011/2012 シーズン後半の分離株、2012/2013 シーズン初期の分離株、および一部の参照株について、重要セグメント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、前シーズンからの傾向を引き継ぎ、NA セグメントに特定のアミノ酸置換を持つ株の増加が見られた。どの型についても、NA セグメントの系統樹と HA セグメントの系統樹は樹形が概ね一致しており、亜型間もしくはクレード間の顕著な再集合は起こっていないと判断された。M セグメント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。薬剤耐性変異については、A(H3N2) でアマンタジン耐性変異を持たない株が 1 株見つかった以外、動向に大きな変化はなかった。次世代型シーケンサーを用いた全 8 セグメント解析について検討を行い、4 日間で 20 株程度の全セグメント解析が可能な暫定プロトコールを作成した。

### 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セグメントの塩基配列を決定し、分子系統解析を行うことにより、薬剤耐性株、高リスク変異株等の早期発見に結びつける。全 8 セグメントを解析するためのプロトコー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 セグメント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や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、重要な遺伝子セグメントの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 セグメント（A 型および B 型）、HA2 領域（A 型および B 型）および M セグメント（A 型のみ）の塩基配列を決定し、概ね 3-6 日以内に結果を感染研に報告した。なお、HA1 領域については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。

塩基配列の決定は、(1) 全セグメント共通のユニバーサル・プライマーによる逆転写、(2) セグメントごとのプライマーによ

る PCR 増幅、(3) 各セグメントにつき 10-16 個のプライマーによるサンガー法シーケンス、(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や変遷について分析を行った。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)およびB型について、前年度までに全8セグメント解析のためのプロトコルを整備したが、今年度は新型のウイルスの出現も視野に、次世代型シーケンサーを用いたウイルス型に依存しない全セグメント解析の手法について検討を行った。

(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。

表1 本事業での遺伝子解析の実績

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
2010/2011	A(H1N1)pdm	75	73
	A(H3N2)	99	99
	B	130	126
2011/2012	A(H1N1)pdm	9	9
	A(H3N2)	186	183
	B	111	110
2012/2013	A(H1N1)pdm	6	6
	A(H3N2)	38	38
	B	16	16
合計		886	869

参照株として前シーズン以前の株を一部含む

## C. 研究結果

### 1. 概要

2012年6月から2013年1月までの間に、7回に分けて、計277件のRNAサンプルを受領し、A型についてはNA、M、HA2の各セグメント、B型についてはNA、HA2の各セグメントの中から必要なセグメントの塩基配列を解析した。昨年度までの分と合わせた本事業における解析実績を表1に示す(重複分を除く)。

### 2. A(H1N1)pdm09の変異解析

#### NAセグメント

2011/2012シーズンおよび2012/2013シーズンはいずれもA(H1N1)pdm09の流行は小規模であった。NAセグメント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、および本事業で昨年度まで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。2011年の4月以降に限定すると、分離された19株はすべて、上記の2個所の変異に加えてV241IとN369Kの変異をもっており、NAセグメントにおいて変異の蓄積が進んでいることが示唆された。これら4個所の変異を持つグループは、HA1の系統ではサブクレード6および7(文献1)に一致した。

昨年度に解析を行った2010/2011シーズン株の中にはH275Yのオセルタミビル耐性変異を持つものがあったが、2011/2012シーズン以降の解析株の中にはH275Y変異を持つものはなかった。

#### Mセグメント

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。2010/2011 シーズン株の解析では 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、それ以降はこの変異を持つものは見つかっていない。

### 3. A (H3N2) の変異解析

#### NA セグメント

NA セグメント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。比較のため昨年度までの解析株のデータを含めた。2010/2011 シーズン以降に分離された株は、2011/2012 シーズンまでのワクチン株であった 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。2011/2012 シーズン以降は後者のグループにさらに L81P と N402D の変異が加わった株が大勢を占めた。特に 2012 年の 7 月以降に分離された 32 株はすべてこのグループに属し、1 株を除いてさらに D93G の変異を持っていた (HA1 の系統樹ではサブクレード 3C に相当)。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。

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見つかっていない。

#### M セグメント

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、2009/2010 シーズンは 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全体の 30% を占めたが、2010/2011 シー

ズンは 15%、2011/2012 シーズンは 0.5%、2012/2013 シーズンは 0% と減少した。散発的な変異を除けば、HA セグメントおよび NA セグメントの場合と同様、昨シーズンの流行によってむしろ均質化が進んだと考えられる。昨年度までに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が、2012 年夏期の分離株のうち 1 株 (A/Taiwan/1057/2012) がこの変異を持っておらず、アマンタジンに対する感受性が変化していることが示唆された。

### 4. B 型の変異解析

2011/2012 シーズンは、シーズン後半に Victoria 系統と Yamagata 系統の混合流行が見られたが、2012/2013 シーズン初期も同様の傾向が見られた。NA セグメントのアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹を図 3 および図 4 に示す。比較のため昨年度までの解析株のデータを含めた。Victoria 系統の国内分離株は Brisbane/60/2008 に類似の株 (HA1 の系統樹ではサブクレード 1a に相当) が大半を占めたが、その中でも N340D のアミノ酸変異を持つものが顕著に増加した。一方、Yamagata 系統は、HA1 の系統樹でクレード 2 とクレード 3 に相当するものに分かれたが、その中ではクレード 2 に属するものが台湾から遅れて国内でも増加する傾向がみられた。I221T の薬剤耐性変異を持つものは、2011 年 7 月以降の分離株の中には見つかっていない。

### 5. 全ゲノム解析プロトコルの整備

現在流行している A (H1N1)pdm09、A (H3N2)、B のすべての型・亜型について、昨年度までにサンガー法による全 8 セグメント解析のためのプロトコルを整備した。今年度は、ベンチトップ型の次世代型シーケンサーであるイルミナ社の MiSeq を用いて、全 8 セグメント解析を行うためのプロトコルの検

討を行った。その結果、①SMART PCR による完全長二本鎖 cDNA の合成、②トランスポゾンのランダム挿入によるシーケンスライブラリーの作成、③MiSeq によるペアエンド・シーケンス、④レファレンス配列へのマッピングの手順で、4 日間で 20 株程度について、全セグメントの全長解析が可能な暫定プロトコルを作成した。

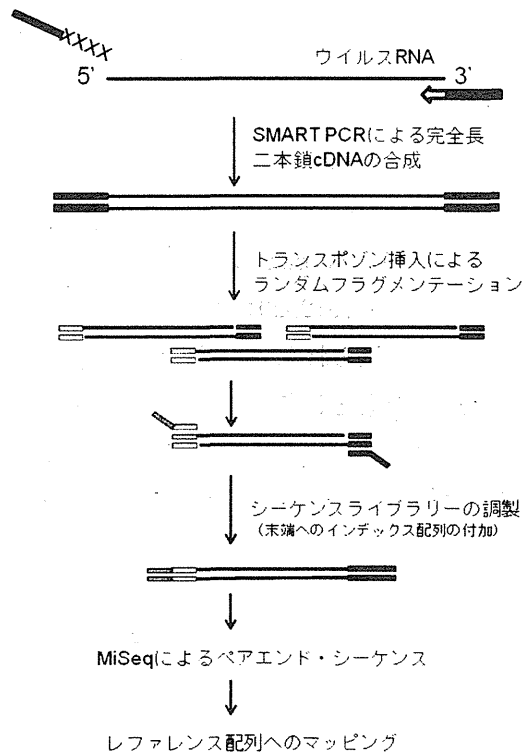


図5 MiSeqによる全セグメント解析の概要

#### D. 考察

A(H1N1)pdm09 亜型、A(H3N2) 亜型、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のいずれにおいても、昨年度に引き続いて NA セグメントの配列シフトが進行していることが示された。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。ただし、いずれの亜型、系統においても、NA セグメントの系統樹と HA セグメントの系統樹は樹形が概ね一致しており、亜型間もしくはクレード間の顕著な再集合は起こっていないと判断された。次世代型シーケンサーを用いた解析は、各セグメントの末端に存在する共通

配列のみに依存し、セグメント内部の塩基配列に依存しないため、新型のウイルスが出現した際にも即座に適用できる可能性が高い。また、得られる配列冗長度は、セグメント末端で数十、中心部で 1,000 以上と、従来法に比べて格段に高いため (図7)、同一株内での配列多型 (薬剤耐性変異等) の定量的な解析にも使用できるメリットがある。データ処理の迅速化や解析費用の圧縮に向けた検討を行い、早期にプロトコルを完成させることが必要である

#### E. 結論

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型においても、前シーズンからの傾向を引き継ぎ、NA セグメントに特定の amino 置換を持つ株の顕著な増加が見られた。M セグメント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。薬剤耐性変異については、A(H3N2) でアマンタジン耐性変異を持たない株が 1 株見つかった以外、動向に大きな変化はなかった。次世代型シーケンサーを用いた全 8 セグメント解析について検討を行い、暫定プロトコルを作成した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 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, 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. 2011/12 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, 33, 288-294, 2012.

[その他]

- 1 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.
- 2 Nagashima, S., Kamimura, A., Shimizu, T., Nakamura-Isaki, S., Aono, E., Sakamoto, K., Ichikawa, N., Nakazawa, H., Sekine, M., Yamazaki, S., Fujita, N., Shimada, K., Hanada, S. and Nagashima, K.V.: Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. *J. Bacteriol.*, **194**, 3541-3542, 2012.
- 3 Tamura, T., Matsuzawa, T., Oji, S., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Katsumata, H., Yamazoe, A., Hamada, M., Suzuki, K.I., Gono, T. and Fujita, N.: A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **102**, 481-491, 2012.
- 4 Kawakoshi, A., Nakazawa, H., Fukada, J., Sasagawa, M., Katano, Y., Nakamura, S., Hosoyama, A., Sasaki, H., Ichikawa, N., Hanada, S., Kamagata, Y., Nakamura, K., Yamazaki, S. and Fujita, N.: Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microtholunatus phosphovorius*. *DNA Res.*, **19**, 383-394, 2012.
- 5 Katano, Y., Fujinami, S., Kawakoshi, A., Nakazawa, H., Oji, S., Iino, T., Oguchi, A., Ankai, A., Fukui, S., Terui, Y., Kamata, S., Harada, T., Tanikawa, S., Suzuki, K. and Fujita, N.: Complete genome sequence of *Oscillibacter valericigenes* Sjm18-20<sup>T</sup> (=NBRC 101213<sup>T</sup>). *Stand. Genomic Sci.*, **6**, 406-414, 2012.
- 6 Aroonsri, A., Kitani, S., Fujita, N., Takahashi, Y., Shin-ya, K., Komatsu, M., Ikeda, H. and Nihira, T.: Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone-autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 8015-8024, 2012.
- 7 Komaki, H., Ichikawa, N., Oguchi, A., Hanamaki, T. and Fujita, N.: Genome-wide survey of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in *Streptomyces turgidiscabies* NBRC 16081. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **58**, 363-372, 2012.
- 8 Yamamura, H., Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Ichikawa, N., Ikeda, H., Sekine, M., Harada, T., Horinouchi, S., Otaguro, M., Tamura, T., Suzuki, K., Hoshino, Y., Arisawa, A., Nakagawa, Y., Fujita, N. and Hayakawa, M.: Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431<sup>T</sup> (=NBRC 102363<sup>T</sup>). *Stand. Genomic Sci.*, **7**, 294-303, 2012.
- 9 Fukuhara, Y., Kamimura, N., Nakajima, M., Hishiyama, S., Hara, H., Kasai, D., Tsuji, Y., Narita-Yamada, S., Nakamura, S., Katano, Y., Fujita, N., Katayama, Y., Fukuda, M., Kajita, S. and Masai, E.: Discovery of pinorexinol reductase genes in sphingomonads. *Enz. Microbial Tech.*, **52**, 38-43, 2013.
- 10 Ichikawa, N., Sasagawa, M., Yamamoto, M., Komaki, H., Yoshida, Y., Yamazaki, S. and Fujita, N.: DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.*, **41**, D408-414, 2013.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

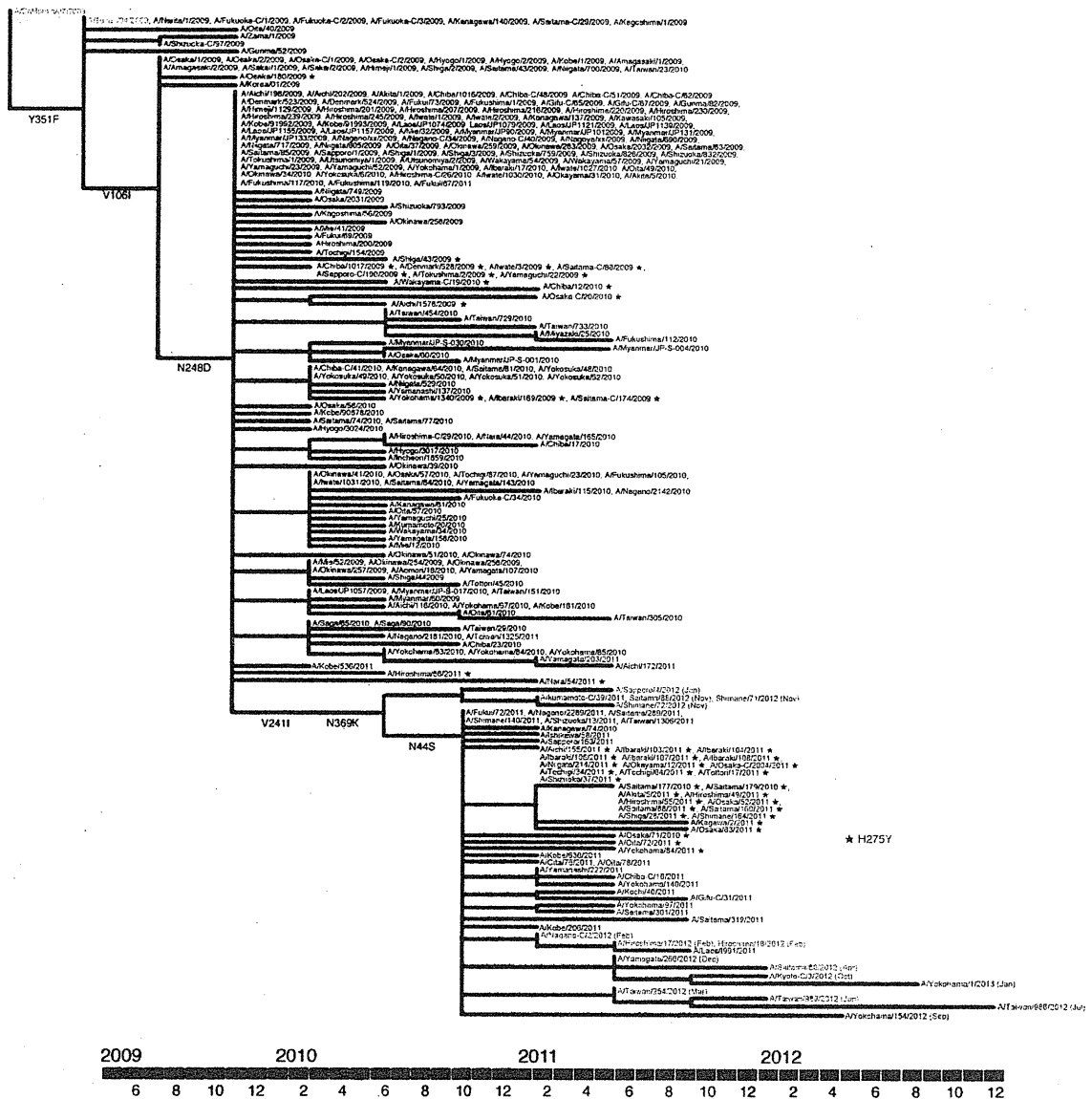


図1 A(H1N1)pdm09のNAセグメントアミノ酸配列に基づく最尤系統樹  
(感染研インフルエンザセンター等で解析された株のデータを一部含む)







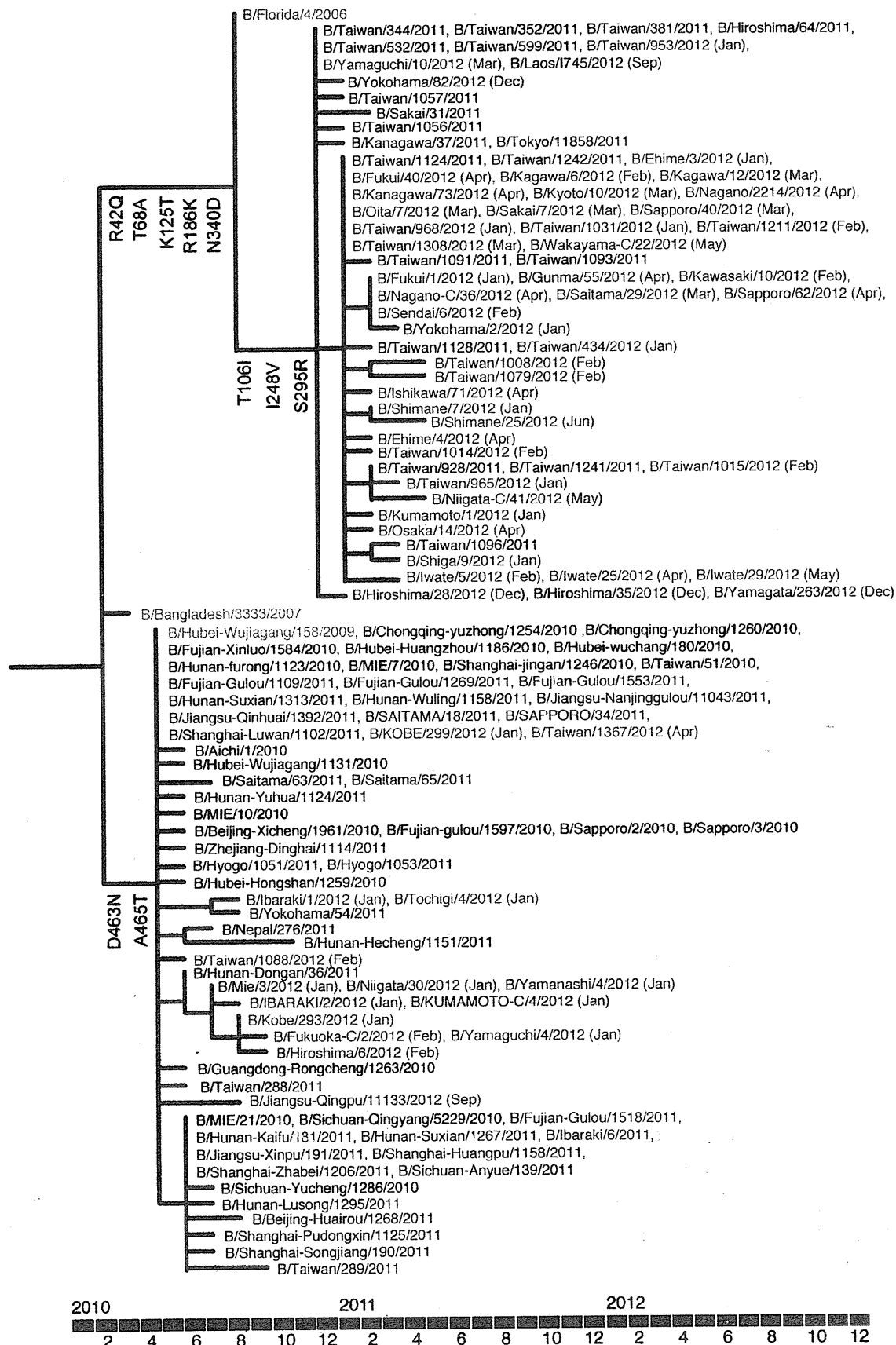


図4 B型 Yamagata 系統の NA セグメントアミノ酸配列に基づく最尤系統樹  
(感染研インフルエンザセンター等で解析された株のデータを一部含む)

## 「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）

### 研究要旨

2012-2013 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、A(H3N2) 抗原、B 抗原に対する血清抗体価の調査を行った。医療従事者 97 名と、高齢入所者 50 名のワクチン接種前後の HA 抗体価を測定し、ワクチン接種前後での比較と成人と高齢者での比較により評価した。結果として、A(H1N1)pdm, A(H3N2), B いずれも接種後には 80-90% を超える有意抗体価 (HI 抗体 40 倍以上) の保有率を認め、GMT の上昇も有意であった。

さらに、成人群では前シーズン (2011-2012) において周囲にインフルエンザ罹患者がいた群 (接触群) といなかった群 (非罹患非接触群) に分けた検討を行った。非罹患非接触群と比べ接触群で接種後の A(H3N2) 抗原に対する抗体価について、有意に低い有効抗体保有率であり、GMT も前後で有意に接触群の値が低かった。罹患者への接触は自己申告によるものであり、かつ、罹患者の型も大半は不明であるため、接触群が事実上の不顕性感染群であったかどうかは不明であり、今後の検討を要する。

### A. 研究目的

2009-2010 のパンデミックシーズンに引き続き、2010-2011 シーズンから流行の主体となった A(H3N2) ウイルスは、少しずつ抗原性を変化させ、2011-2012 シーズンに大きな流行を引き起こした。2011-2012 シーズンの A(H3N2) ワクチン株は A/Victoria /210/2009 であり、流行株と 8 倍以上の抗原性変異のあるウイルスが流行初期より増加傾向にあった。世界全体でも同様の傾向にあり、WHO は総合的な判断により、2012-2013 シーズンから A/Victoria /361/2011 を推奨した。これにより、本邦における A(H3N2) ワクチン株も変更となった。一方で、B 型の流行はビク

トリア系統が山形系統と比べて優位に流行する中で、シーズンの後半には山形系が増加傾向であったものの、山形系統に対する抗体保有は低い状況であることから、B 型ワクチン株もビクトリア系統の B/Brisbane/60/2008 から WHO 推奨株でもある山形系統の B/Wisconsin/1/2010 へ変更となった。

本調査では、A(H3N2)、B のワクチン株変更後、最初のインフルエンザ流行シーズンとなる 2012-2013 シーズンにおける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、本シーズンの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。