

of Japan. Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in Japan. 15th International Congress of Virology SY-53-1 札幌 2011年9月

14) Miyoshi M, Yoshizumi S, Ishida S, Komagome R, Nagano H, Kudo S, Okano M. Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens. 15th International Congress of Virology PO-38-1 札幌 2011年9月

15) 原田幸子, 新開敬行, 吉田勲, 長島真美, 林志直 他 3 名 東京都内における低凝集性インフルエンザ A/H1N1pdm09 ウイルス株の浸淫状況 第 26 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 静岡県静岡市 2011年9月

16) 加瀬哲男, 前田章子, 中田恵子, 入江 伸, 大藤さとこ, 廣田良夫 2010/11 シーズンインフルエンザワクチンによって誘導された A(H3N2)野生株に対する抗体 第 15 回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日

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

18) 川上千春, 七種美和子, 豊澤隆弘 2010/2011 シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬剤耐性変異ウイルス 第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会 岡山 2011年10月

19) 吉富秀亮, 石橋哲也, 田上四郎, 世良暢之, 松田健太郎 喘鳴を呈する乳幼児からの呼吸器系ウイルスの検出状況について 第 58 回福岡県公衆衛生学会 福岡県 福岡市 2011年5月

20) 安達啓一, 安井善宏, (ほか7名), 皆川洋子 呼吸器系ウイルスの検出法に関する研究 平成 23 年度愛知県公衆衛生研究会 愛知県大府市 2012年1月

21) 原田幸子, 新開敬行, 吉田勲, 長島真美, 尾形和恵, 林志直, 甲斐明美 低凝集性インフルエンザウイルスのヘマグルチニンアミノ酸変異について 日本進化学会第 14 回東京大会 東京都 2012年8月

22) 吉田勲, 新開敬行, 原田幸子, 長島真美,

林志直 他 4 名 2011-2012 シーズンの A 型インフルエンザウイルスの分離について 第 27 回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 山梨県甲府市 2012年9月

23) 川上千春, 七種美和子, 宇宿秀三, 高下恵美, 小田切孝人, 田代真人 免疫抑制患者において薬剤投与後持続感染がみられた 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 大阪 2012年11月

24) 安井善宏, 藤原範子, 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子 愛知県で分離したインフルエンザウイルス AH3 の分子疫学的解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年11月

25) 小淵正次, 堀元栄詞, 稲崎倫子, 名古屋(小原)真弓, 板持(岩井)雅恵, 佐多徹太郎, 滝澤剛則 A 型インフルエンザウイルス市中株およびノイラミニダーゼ阻害薬投与患者由来株における薬剤耐性変異の検出 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012年11月

26) 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 大阪 2012年11月

27) 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 大阪 2012年11月

28) 川上千春, 七種美和子, 豊澤隆弘 薬剤投与後長期間排泄された AH3 型インフルエンザウイルスの変異 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 北九州 2012年11月

### 3. シンポジウム、講演等

1) 平良勝也ほか 沖縄県における新型インフルエンザ流行状況について シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿児島市 2010年5月26日

2) 川上千春ほか 横浜で分離した新型インフルエンザウイルス AH1pdm の分子疫学解析 シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿児島市 2010 年 5 月 26 日

3) 高橋和郎、加瀬哲男ほか 新型インフルエンザにおける不顕性感染の発生頻度に関する研究 シンポジウム II 新型インフルエンザ 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 鹿児島市 2010 年 5 月 26 日

4) 川上千春、高下恵美、森 愛、杉田繁夫、信澤枝里 シンポジウム「新型インフルエンザ H1N1 ウイルスの系統的進化と糖鎖進化のレビュー」第 24 回インフルエンザ研究者交流の会 シンポジウム 長野 2010 年 7 月

5) 皆川洋子、秦 眞美、安井善宏、山下照夫、小林慎一、鳥インフルエンザ発生時に地方衛生研究所に求められるスクリーニング機能について、シンポジウム III インフルエンザウイルス 衛生微生物技術協議会第 32 回研究会 江戸川区 2011 年 6 月 30 日

6) 川上千春、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、岩田眞美、豊澤隆弘、高下恵美、江島美穂、小田切孝人、田代眞人 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 富山 2011 年 6 月

7) 川上千春、七種美和子、高下恵美、江島美穂 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 福島 2012 年 5 月

8) 安井善宏、ほか 3 名、皆川洋子、小田切班コア・サポート地衛研、インフルエンザ関連サーベイランスの問題点—地衛研の立場から—、シンポジウム III インフルエンザウイルス 衛生微生物技術協議会第 33 回研究会 横浜市 2012 年 6 月 29 日

9) 水田克己、追加発言、シンポジウム III

インフルエンザウイルス 衛生微生物技術協議会第 33 回研究会 横浜市 2012 年 6 月 29 日

10) 田中智之、調 恒明、浅利誠志、村瀬充範、和山行正 教育シンポジウム：本邦における感染症検査機関：大学附属病院/民間検査機関/地方衛生研究所における BSL 整備状況、検査対象ウイルス及び検査内容の現状について 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012 年 11 月

### 3. その他

1) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐 紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山 努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調 恒明  
インフルエンザ診断マニュアル(第 2 版)

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab-manual.html#class5>

2) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐 紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山 努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調 恒明  
高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab-manual.html#class5>

### 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

## リアルタイム PCR 法を用いた H275Y オセルタミビル耐性株の検出系の構築およびインフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)の外部精度管理(EQA)評価について

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 室室長

研究協力者：高山 郁代 同上 研究員  
中内 美名 同上 主任研究官  
高橋 仁 同上 主任研究官

### 研究要旨

2009 年 4 月以降、ブタインフルエンザウイルスに由来した A/H1N1 インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)が世界規模で大流行(パンデミック)し、A/H1N1pdm の流行が広がるにつれ、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸に特徴的な変異(H275Y)を持つオセルタミビル耐性株が散発的に検出されるようになった。

本研究では NA 遺伝子の部分シーケンス法よりも簡便で迅速なリアルタイム PCR 法を用いた H275Y 変異検出法の開発を行った。その結果、A/H1N1pdm オセルタミビル耐性株の国内発生状況を迅速に把握する事が可能となり、我が国の薬剤耐性株サーベイランス事業にも大きく貢献した。

新型インフルエンザの発生時は、感染拡大防止策の実施のため、全国の地方衛生研究所において新型インフルエンザに対する PCR 検査の実施が求められる事になり、全国で適切に新型インフルエンザの確定検査が実施できるよう、地方衛生研究所においては、その検査体制の整備が急務となっている。本研究では全国の地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査の精度向上を目的とする全国的な外部精度管理(EQA)評価導入を行うために、試験的に 11 か所のコア・サポート地方衛生研究所に対して 2 回の EQA を実施した。

### A. 研究目的

#### H275Y オセルタミビル耐性株検出系構築

日本は世界最大のオセルタミビル使用国であり、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関での治療方針の見直しが必要となる。そのため耐性株の迅速な発生状況の把握が、公衆衛生上極めて重要である。

2009 年 4 月以降、ブタインフルエンザウイルス由来の A/H1N1 インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)が世界規模の大流

行(パンデミック)を引き起こしたが、流行が広がるにつれ、NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸に特徴的な変異(H275Y)を持つオセルタミビル耐性株が散発的に検出されるようになった。

本研究では、NA 遺伝子の部分シーケンス法よりも、簡便で迅速なリアルタイム PCR 法を用いた H275Y 変異の検出法の構築を目的として本研究を行った。

#### 外部精度管理(EQA)評価

新型インフルエンザ対策の一環として策定された「新型インフルエンザ対策行動計画」が平成 23 年 9 月 20 日に最終改定された。また、「新型インフルエンザ等対策特別措置法」が平成 24 年 5 月 11 日に公布され、新型インフルエンザの発生時は、感染拡大防止策の実施のため、全国の地方衛生研究所において新型インフルエンザに対する PCR 検査の実施が求められる事になり、全国で適切に新型インフルエンザの確定検査が実施できるよう、地方衛生研究所においては、その検査体制の整備が急務となっている。

近年は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスや H3N2 亜型ブタインフルエンザウイルスなど、季節性インフルエンザウイルス以外でも、海外においてはヒトへの感染が散発的に発生しており、これらのウイルスを起源とするヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスの出現も危惧されている。わが国において、新型インフルエンザ発生時に、検査体制を速やかに構築するためには、地方衛生研究所において正確にインフルエンザ核酸診断検査を行える体制を平時の間に築いておく事が重要であり、その体制づくりの一環として、検査精度の向上を図るために、11 か所のコアおよびサポート地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査について、外部精度管理(EQA)評価を行った。

## B. 研究方法

### H275Y オセルタミビル耐性株検出系構築

A/H1N1pdm の NA 遺伝子配列をもとに、823 番目の核酸が C(H275)であるオセルタミビル感受性株を検出する蛍光プローブ(VIC 標識)と T(Y275)である耐性株を検出する蛍光プローブ(FAM 標識)をそれぞれ設計した。これらのプローブ領域を挟むようにプライマーを設計した。これらを用いて、H275 を持つ株と Y275 を持つ株を識別する duplex one-step RT-PCR 系を構築した。ブラック精製をして得られた

A/Denmark/524/2009 (H275) 、  
A/Denmark/527/2009 (Y275) 株 、  
A/Chiba/1016/2009 (H275) 株 、 A/  
Chiba/1017/2009 (Y275)株より精製した陽性コントロール RNA、各自治体の地方衛生研究所および感染研で分離及び NA 遺伝子シーケンスした 2009/10 シーズンの A/H1N1pdm 臨床分離株および季節性ヒトインフルエンザ臨床分離株を用いて、反応条件の至適化および検査系の検証を行った。臨床分離株については、RNA 抽出を行わずに感染細胞の培養上清を直接リアルタイム RT-PCR に用いて検査の簡便化についても検討した。また、本研究では Roche Lightcycler 480II と解析ソフト SW1.5 を用いて検証を行ったが、全国地方衛生研究所での実施にあたり、他の検出機器でも本法の有用性の検討と最適化を行った。

### 外部精度管理(EQA)評価

EQA については全国的に展開する前の試験的实施を、コアおよびサポート地方衛生研究所(北海道衛生研究所、山形県衛生研究所、横浜市衛生研究所、富山県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、堺市衛生研究所、山口県環境保健センター、福岡県保健環境研究所、沖縄県環境研究所、愛知県衛生研究所、東京都健康安全研究センター)の 11 カ所に対して、平成 23 年度および平成 24 年度に各一回ずつ行った。

平成 23 年度は、パネル検体として H5N1 亜型の標準 RNA、未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA 7 検体、濃度の異なる不活化 A/California/7/2009 ワクチン株 2 検体および陰性検体 1 検体を送付した。H5N1 亜型の標準 RNA は各地衛研で 10 倍階段希釈を作製し、リアルタイム RT-PCR 法による亜型同定用のスタンダードに用いた。未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA は各地衛研のプロトコールによりウイルス RNA の検出および亜型同定するように依頼した。ワクチン株および陰性検体は、各地衛研のプロトコールにより RNA 抽

出を行ってから、ウイルス RNA の検出および亜型同定するように依頼した。

平成 23 年度は、パネル検体として未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA 10 検体(うち 4 検体は核酸抽出済み、6 検体は不活化ウイルス粒子またはウイルス核酸を含み核酸抽出を行う必要がある)を送付し、「H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染疑い例が含まれた検査依頼」として検査を実施するように依頼した。

それぞれ、送付した実施要項に従い検査を実施するように依頼し、検査結果を集計してリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査に対する外部精度管理評価を行った。

### C. 研究結果

#### H275Y オセルタミビル耐性株検出系構築

陽性コントロール RNA を用いて、様々な組み合わせのプライマー&プローブを検討した結果、プライマーは H1N1NA-F690-719:ATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTAC、H1N1NA-R847-872:ACACATGTGATTC ACTAGAATCAGG、プローブは FAM-274Ya-swH1N1-F823-835 (耐性株検出用):(FAM)TACTATGAGGAAT(MGB)、VIC-H274a-swH1N1-F823-835 (感受性株検出用):(VIC)CACTATGAGGAAT(MGB)の組み合わせにより高感度に耐性株と感受性株を識別して検出する事が可能となった。さらに RNA 抽出を行わずに、感染細胞の培養上清を直接リアルタイム RT-PCR 反応液に加える事で、検査系をより簡便化できるかどうかの検討を行った。細胞培養液中には様々な RT-PCR 反応を阻害する物質が含まれており、それらの影響を受けずに検査系がきちんと機能するように、反応試薬および反応条件の最適化を検討する必要がある。各社から市販されている様々な試薬を検討したところ、キアゲン社の QuantiTect Virus + ROX Vial kit が最適であった。また、本試薬を用いることにより、2 時間以内で解析結果を得ることが可能であった。また、

細胞培養試薬組成によっては RT-PCR 反応が阻害される場合があったが、滅菌蒸留水で 10 倍希釈を行う事で、RT-PCR の反応阻害が解消された。今回構築した検出系では、A/H1N1pdm 臨床分離株および季節性ヒトインフルエンザ臨床分離株を用いて検討した結果、全ての臨床分離株は H275Y、Y275Y、または両者の mix に識別され、その結果はシーケンスの結果と一致した。また、他の亜型の分離株との交差反応性は認められず、A/H1N1pdm 亜型特異的な H275Y 変異の検出が可能であった。

全国地方衛生研究所での使用予定機器に関して調査した結果、Roche Lightcycler 480II 以外では、ABI 社では 5 機種、3 種類の解析ソフト、また Agilent 社では 1 機種、1 種類の解析ソフトを使用予定であり、それぞれの機器を用いて試薬と反応条件の最適化を行った。

#### 外部精度管理(EQA)評価

コアおよびサポート地方衛生研究所で行った試験結果および感染研で行った試験結果を集計し、詳細解析を行った。解析した結果、問題が見つかった場合は個別にフィードバックを行った。

### D. 考察

#### H275Y オセルタミビル耐性株検出系構築

今回構築したリアルタイム RT-PCR 法を用いた H275Y 変異の検出法は、感染細胞の培養上清(RT-PCR 反応阻害が起きる場合は、滅菌蒸留水で 10 倍希釈した培養上清を用いる)とリアルタイム RT-PCR 反応液を混合し、リアルタイム PCR 機器で反応するだけで臨床分離株の H275Y 変異スクリーニングを非常に簡便に行える方法である。また、本検出系は非常に高感度(7.5 copies/reaction)に同定できるため、臨床検体なども核酸精製を行えば、高感度な A/H1N1pdm 亜型特異的 H275Y 変異株の検出が可能である。

#### 外部精度管理(EQA)評価

平成 23 年度は、標準 RNA の 10 倍階段希釈作成は同一のチップ、チューブ、希釈液の使用および希釈液の作成は 200  $\mu$ l までを計測できるピペッターを 1 本のみを使用してもらい、各地衛研間での濃度誤差が少なくなるように 10 倍階段希釈の作製の作製を依頼した。リアルタイム RT-PCR 法により Type A および H5 HA の検出を行ってもらい、標準 RNA 原液の Type A 検出時の Ct (Cp) 値を「20」として換算して、標準 RNA を用いた Type A、H5 HA の検出感度について各地衛研間で比較した。その結果、薄い濃度の標準 RNA で Type A および H5 HA が検出できなくなるケースが一部の地衛研で見られた。これらの結果解析から測定機器のトラブルあるいは試薬の劣化などに原因があると推定する事ができた。対象の地衛研には原因を報告しトラブルシューティングを行ってもらった。

未知濃度の亜型同定用ウイルス RNA を用いた H1pdm、H3、H5 亜型の同定および検出精度の確認を行った結果、一部の地衛研で RNA 濃度の低い検体で正確に亜型同定ができないケースがあった。これらの結果から測定機器のトラブルや試薬の劣化など原因が推定できる場合については対象の地衛研に報告しトラブルシューティングを行ってもらった。また、偽陽性(本来は陰性のサンプルに対して何らかの原因により陽性となった)が出てしまったケースも一部の地衛研で見られたが、この場合はサンプルの分注過程におけるヒューマンエラーによる分注ミスが原因と考えられ、検査手順書の整備や検査手順の見直し等が必要と考えられた。

RNA の抽出については、今回は比較的ウイルス濃度の濃い検体を送付したため、地衛研間で RNA 抽出効率による検出感度の大きな差は出なかった。

平成 24 年度は、各地衛研に統一した 4 検体の標準 RNA (H5N1 亜型) を配布し、これら検体を含め、Type A を含んだリアルタイム RT-PCR 法を行ってもらい、最も濃度の濃い標準 RNA 原液に対する Type A

の Ct (Cp) 値を「20」として、全ての検体についての Ct (Cp) 値を算出し、Type A (およびそれ以外の型・亜型) 検出系に対する検出感度を各地衛研間で比較した。その結果、後に測定機器および試薬に問題がある事が判明した一カ所の地衛研を除いて、10 copies/ $\mu$ L までの濃度の H5N1 亜型ウイルス RNA について Type A および H5 とともに同定する事ができた。サンプルの取り違いや、サンプルの混入によるコンタミネーションはなかった。

核酸抽出方法については、地衛研毎に抽出に用いるサンプル使用量および核酸抽出量が異なり、核酸抽出後の Ct (Cp) 値は直接比較できないため、標準 RNA の増殖曲線を参考に Ct (Cp) 値の換算を行い比較した結果、1 カ所で不活化ウイルスからの核酸抽出の効率が悪くなっている可能性が考えられた。

## E. 結論

### H275Y オセルタミビル耐性株検出系構築

今回、新たに構築した本検出法により、NA 遺伝子の部分シーケンス法よりも簡便で迅速に A/H1N1pdm 亜型インフルエンザウイルスの H275Y 変異株を検出することが可能となった。A/H1N1pdm オセルタミビル耐性株発生状況を迅速に把握する事が可能となり、全国規模の薬剤耐性株サーベイランス事業に大きく貢献した。

### 外部精度管理(EQA)評価

どこの地衛研でも同じ精度・特異性・感度でインフルエンザウイルスの核酸検出検査を行えるようにするためには、各地衛研の検査精度を管理する事が重要である。本研究による EQA 実施により問題点が明らかになったケースではトラブルシューティングを行い、問題点を改善することで検査精度の向上につながった。従って定期的な EQA の実施はインフルエンザウイルスの核酸検出検査の精度管理および精度維持には必須と考えられる。

平成 23 年度に実施した EQA 後にトラ

ブルシューティングを行った地衛研が多かったためか、平成 24 年度度は後に測定機器および試薬に問題がある事が判明した一カ所の地衛研を除いて、各地衛研のリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 亜型同定に大きな問題はない事が今回の EQA により確認する事ができた。

新型インフルエンザウイルスの出現直後は、検出用試薬が間に合わなくて除外診断(例えば Type A 陽性、H1pdm 陰性、H3 陰性の場合、新型インフルエンザが疑われる)断が中心になる可能性もあり、日頃サーベイランス等で行っている亜型同定の検査精度を維持する事が非常に重要となる。

また、検出用試薬が全国に配布された場合は、すぐさま検査できる態勢を整える必要があるため、検査に関連する人員の技術向上を図っておく必要がある。常日頃の検査において検査精度が維持されていなければ、新型インフルエンザが発生した際にも、精度の高い検査ができず陽性例の見逃しや偽陽性例など誤った結果を出す可能性が非常に高くなるため、新型インフルエンザ発生時の感染拡大防止を行うための初動対応を確実にするためにも、各地衛研において精度の高い検査体制を常に維持するためにも、EQA の実施は非常に有効である。

しかし、我が国には 70 カ所以上の地衛研があり、現在の地衛研のキャパシティを考えると、昨年度行った EQA の実施内容では明らかに地衛研の負担が大きく、また、解析数も膨大となるため、全国的な EQA の実施は困難と考えられた。今回の EQA では検体数を大幅に減らして EQA の実施を行っているが、それでもリアルタイム RT-PCR の精度管理と核酸抽出の精度管理を同時に行う事が可能であったため、今回実施した EQA の内容であれば、全国的な EQA の実施も可能であると考えられる。しかし、今回の EQA は、昨年度の EQA 後のトラブルシューティングにより問題点を解消した後に行っているため、それ程大きな問題点が浮上しな

かったと考えられる。

全国的な EQA を実施する際は、まずは検査精度に問題点があるかどうか分かる EQA を先に実施して、次に問題があるのはリアルタイム RT-PCR の検出系なのか核酸抽出なのかが分かる EQA を実施するなど、回数を分けて段階的に EQA を実施する事が効率的であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65(1):19-27, 2012.
- 2) Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*, 86(19):10805-20, 2012
- 3) Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard. Application of deglycosylation to SDS PAGE

- analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals*, 40(1):96-99, 2012
- 4) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 188(1-2):73-75, 2013.
- 5) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology*. (in press)
- 6) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版) 国立感染症研究所 2012, [http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian\\_influenza\\_2003.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf)
- 7) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. インフルエンザ診断マニュアル(第2版) 国立感染症研究所 2012, [http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza\\_2003.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf)
- 8) Makoto Ujike, Kozue Shimabukuro, Kiku Mochizuki, Masatsugu Obuchi, Tsutomu Kageyama, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan.: Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A (H1N1) during 2007–2009 Influenza Seasons, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6):926-935, 2010
- 9) Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa, Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihira, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, 83(1):10-15, 2011
- 10) Mina Nakauchi, Yoshihiro Yasui, Tatsuya Miyoshi, Hiroko Minagawa, Tomoyuki Tanaka, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama.: One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *Journal of Virological Methods*. 171(1):156-162, 2011

学会発表

国内会議

- 1) 影山努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第33回研



- 究会. 2012年6月
- 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
  - 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の2例. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
  - 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人. 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
  - 9) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
  - 10) 森安義、仙波晶平、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山 努、中内美名: 遺伝子迅速診断としての LAMP 法. 第51回日本臨床ウイルス学会、2010年6月
  - 11) 仙波晶平、森安義、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山 努、中内美名: LAMP 法を用いたインフルエンザウイルスの簡易迅速遺伝子検査法. 第17回日本遺伝子診療学会大会、2010年8月
  - 12) 中内美名、高山郁代、高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、氏家誠、小淵正次、大場邦弘、許斐奈美、小田切孝人、田代真人、影山 努、全国地方衛生研究所: A/H1N1pdm タミフル耐性株の迅速検出法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月
  - 13) 影山 努、中内美名、田代真人、吉川哲史、中井英剛、菅田健、吉川明子、浅野喜造、井平勝: Direct RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルス A/H1N1pdm 検出法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月
- 国際会議
- 1) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura.

- Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012
- 2) Mina Nakauchi, Tsutomu Kageyama, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Emi Takashita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kunihiro Oba, Nami Konomi, and the working group for influenza virus surveillance in Japan.: A rapid genotyping of oseltamivir-resistant or susceptible pandemic A/H1N1 2009 influenza viruses by duplex RT-PCR assay. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010, September
- 3) Tsutomu Kageyama, Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa,

Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihirac and Masato Tashiro. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010, September

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

## 日本国内における抗インフルエンザ薬耐性ウイルス監視体制の構築 および強化に関する研究

研究分担者 高下恵美

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官

### 研究要旨

2009 年に出現した A(H1N1)pdm09 ウイルスは、その後世界中に広がり、パンデミックを引き起こした。A(H1N1)pdm09 の治療には主に 4 種類の NA 阻害剤（オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビル）が用いられるが、NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル耐性株が国内外で散発的に検出されている。そこで我々は全国地方衛生研究所と共同で、2009 年 9 月から A(H1N1)pdm09 ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施し、継続的に耐性ウイルスの監視を行っている。2010/11 シーズンには、高感度かつ簡便な TaqMan RT-PCR 法を新規に開発し、地方衛生研究所でのサーベイランスに導入した。その結果、日本全域における薬剤耐性株の発生状況を迅速により正確に把握することが可能になった。さらに、薬剤感受性試験系の改良を行い、試験の効率と精度の上昇を図った。日本国内における A(H1N1)pdm09 ウイルスの H275Y 耐性変異株検出率は、2008/09 シーズン分離株では 0.5%、2009/10 シーズンは 1.1%、2010/11 シーズンは 2.0%とわずかながら増加傾向が認められた。検出された H275Y 耐性変異株は薬剤感受性試験において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し、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。H275Y 耐性変異株のうち薬剤未投与例からの検出が増加しており、海外でも同様の傾向にある。また、A(H1N1)pdm09 ウイルスと並行して、A(H3N2)および B 型ウイルスに関する耐性株サーベイランス体制の強化を図った結果、NA 蛋白に R292K 耐性変異をもち、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) ウイルスが検出された。以上の結果から、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスでは、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、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。

### A. 研究目的

2009 年に出現した A(H1N1)pdm09 ウイルスは日本を含む世界全域に広がり、パンデミックを引き起こした。A(H1N1)pdm09 ウイルスはその後も、A(H3N2)および B 型ウイルスと混在して流行を続けており、世界各国でウイルスが検出されている。A(H1N1)pdm09 の治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白を標的とする抗インフルエンザ薬、オセルタミビル（商品名タミフル）とザナミビル（商品名リレ

ンザ）が使用されている。世界各国で分離される A(H1N1)pdm09 ウイルスのほとんどは両薬剤に対して感受性であるが、国内外で散発的に、NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であることから、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる。したがって、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握し、自治体およ

び医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極めて重要である。そこで我々は全国地方衛生研究所と共同で、2009年9月に、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、2010年1月に国内販売が開始されたペラミビル（商品名ラピアクタ）、および、2010年10月に国内販売が開始されたラニナミビル（商品名イナビル）を含む4種類の薬剤についてサーベイランスを実施している。またA(H1N1)pdm09ウイルスのサーベイランスと並行して、A(H3N2)およびB型ウイルスについても上記4薬剤に対する耐性株サーベイランスを行った。

## B. 研究方法

A(H1N1)pdm09分離株について、各地方衛生研究所において毎週概ね3株を目標値として、NA遺伝子の部分シーケンス法またはTaqMan RT-PCR法によりH275Y耐性マーカーを検索する1次スクリーニングを行った。H275Y耐性マーカーをもつ分離株については、引き続き国立感染症研究所において遺伝子解析および薬剤感受性試験を実施した。また、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)に登録された株の約5-15%をコンピュータでランダムに選択し、国立感染症研究所において遺伝子解析および薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験はNA-StarまたはNA-XTD基質を用いた化学発光法あるいはMUNANA基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する $IC_{50}$ 値を算出した。遺伝子解析は、NA遺伝子の全長シーケンス法により、NA蛋白における既知の薬剤耐性マーカーを検索した。

## C. 研究結果

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が開始された2009/2010シーズンには、地方衛生研究所での1次スクリーニングには、NA遺伝子の部分シーケンス法が採用されていた。

2010/11シーズンには、高感度かつ簡便なTaqMan RT-PCR法を新規に開発し地方衛生研究所でのサーベイランスに導入した。その結果、2009/2010シーズンには37都道府県、53地方衛生研究所で実施されていた1次スクリーニングが、2010/2011シーズンには全47都道府県、71地方衛生研究所にまで拡大した。すべての都道府県で薬剤耐性株サーベイランスが実施されたことにより、日本全域における薬剤耐性株の発生状況を迅速により正確に把握することが可能になった。TaqMan RT-PCR法では、薬剤感受性株とH275Y耐性変異株に加えて、両者の混合株を区別して検出することができる。混合株について薬剤感受性試験を行った結果、化学発光法では、正確な $IC_{50}$ 値を得られないことが明らかになった。そこで、試験系を改良し、2011/12シーズンからは、すべての解析株について蛍光法により薬剤感受性試験を実施することで、試験の効率と精度の上昇を図った。

2008/09シーズンのA(H1N1)pdm09分離株2,168株のうち、10株でH275Y耐性マーカーが検出された。2009/10シーズンは6,005株のうち69株、2010/11シーズンは3,844株のうち78株がH275Y耐性変異株で、耐性株検出率は、2008/09シーズンは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た。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。H275Y耐性マーカーをもつ分離株について薬剤感受性試験を行った結果、すべての株はオセルタミビルに対して耐性であることが確認された。また、すべてのオセルタミビル耐性株はペラミビルに対して交叉耐性を示した。一方、すべてのオセルタミビル・ペラミビル交叉耐性株はザナミビルとラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

A(H3N2)分離株は、2008/09シーズンには195株、2009/10シーズンは49株、2010/11シーズンは135株、2011/12シーズンは290株について薬剤感受性試験を行った。その結果、2010/11シーズンおよび2011/12シ

ーズンに、NA 蛋白に R292K 耐性変異をもち、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) ウイルスがそれぞれ 1 株検出された。この 2 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、2008/09 シーズンには 141 株、2009/10 シーズンは 113 株、2010/11 シーズンは 147 株、2011/12 シーズンは 263 株について薬剤感受性試験を行ったが、耐性株は検出されなかった。

#### D. 考察

日本国内における A(H1N1)pdm09 ウイルスの H275Y 耐性変異株検出率は、2008/09 シーズン分離株では 0.5%、2009/10 シーズンは 1.1%、2010/11 シーズンは 2.0% とわずかながら増加傾向が認められた。2010/11 シーズンの検出率 2.0% は、オセルタミビル耐性 A(H1N1) ウイルスが国内に侵入する以前の 2007/08 シーズンの日本国内における耐性株検出率 2.6% を超えていない。しかし、約半年後の 2008/09 シーズンには耐性株の検出率が 99.6% に達したことから、注意が必要である。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 ウイルスの流行はほとんどみられなかった。しかし、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。

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

に薬剤未投与例からの検出が増加傾向にあり、今後も注意深く監視を続ける必要がある。

2010/11 シーズンおよび 2011/12 シーズンには NA 蛋白に R292K 耐性変異をもち、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) ウイルスがそれぞれ 1 株検出された。したがって、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスでは、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、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。

#### E. 結論

日本国内における A(H1N1)pdm09 ウイルスの耐性株検出率は、2008/09 シーズンから 2010/11 シーズンにかけてわずかながら増加傾向が認められた。また、薬剤の未投与例から検出される耐性株の割合が半数近くを占め、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆されたことから、今後も引き続き、薬剤耐性株の発生状況について、注意深く監視を続ける必要がある。

また、A(H3N2) および B 型ウイルスに関する耐性株サーベイランス体制の強化を図った結果、A(H3N2) ウイルスの薬剤耐性株が検出され、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、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

Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H. Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus. *BMC Infectious Diseases*, 10:170, 2010.

Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike M, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H,

Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan. *PLoS One*. 5:e11057, 2010.

Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y. Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults. *Journal of Medical Virology*, 82:2092-2096, 2010.

Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S. Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *Journal of Virology*, 85:1322-1329, 2011.

M.Nakauchi, M.Ujike, M.Obuchi, E.Takashita, I.Takayama, M.Ejima, K.Oba, N.Konomi, T.Odagiri, M.Tashiro, T.Kageyama and the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*, 83,1121-1127,2011

M.Ozawa, ST.Victor, AS.Taft, S.Yamada, C.Li, M.Hatta, SC.Das, E.Takashita, S.Kakugawa, EA.Maher, G.Neumann and Y.Kawaoka. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. *Journal of General Virology*, 92,2879-2888,2011

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

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

Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E. Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, June 2010

Takashita E, Ujike M, Ejima M, Fujisaki S, Obuchi M, Kim N, Kishida N, Xu H, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Tashiro M, Odagiri T. Detection and characterizations of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses in the 2009/10 season in Japan. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

Nakauchi M, Kageyama T, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Odagiri T, Tashiro M, Oba K, Konomi N, the working group for influenza virus surveillance in Japan. A rapid genotyping

of oseltamivir-resistant or -susceptible pandemic A/H1N1 2009 influenza viruses by duplex RT-PCR assay. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

Kishida N, Xu H, Takashita E, Obuchi M, Fujisaki S, Ujike M, Ito R, Doi T, Sugawara H, Ejima M, Kim N, Ami Y, Suzaki Y, Yamashita K, Yasui Y, Tada Y, Okabe N, Tashiro M, Odagiri T. Characterizations of influenza viruses isolated during the 2009/10 season in Japan and neighboring countries. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S. The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K. Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

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、小淵正次、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.

浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美名、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人：新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) の増殖性に関する検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月.

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、小淵正次、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.

中内美名、高山郁代、高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、氏家誠、小淵正次、大場邦弘、許斐奈美、小田切孝人、田代真人、影山努、全国地方衛生研究所：A/H1N1pdmタミフル耐性株の迅速検出法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月.

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、金南希、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剤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剤耐性ウイルス 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/H1N1pdm09) viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in Japan. XV International Congress of Virology, September 2011

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

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

N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Ito, T.Doi, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Ejima, N.Kim, R.Saito, H.Ikematsu, M.Tashiro and T.Odagiri : Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells. XV International Congress of Virology, September 2011

C.Kawakami, E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kim, S.Usuku, E.Kurata, M.Iwata, T.Toyozawa, T.Odagiri and M.Tashiro : Neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan. XV International Congress of Virology, September 2011

M.Nakauchi, E.Takashita, M.Tashiro, H.Nishimura and E.Nobusawa : Analysis of antigenic sites on the HA protein of Pandemic

influenza A(H1N1)pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, September 2011

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

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

I.Takayama, E.Takashita, M.Ejima, M.Nakauchi, S.Fujisaki, N.Kim, N.Kishida, H.Xu, H.Sugawara, R.Itoh, T.Doi, T.Kageyama, T.Odagiri and M.Tashiro : Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, November 2011

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

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。これを用いて 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未報告の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。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。研究代表者らと共同で研究成果を論文とし、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。

### 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 蛋白質の構造解析に拡張し、問題となりうる変異型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。本体研究などにより、(i) パンデミックインフルエンザウイルス A (H1N1)pdm の HA 蛋白質に特徴的な変異が維持されていること、(ii) 近年の A 香港型と B 型ワクチン原株の調製時に特徴的な変異が生じること、(iii) 近年の B 型ヴィクトリア系統株に薬剤耐性と連動する未報告の変異が生じること、などがわかり、それらの変異のリスクを構造情報も取り入れて評価する必要が生じた。そこで変異株の HA また

はNA蛋白質の機能構造モデル(多量体構造)を構築し、変異の影響を構造レベルで考察した。

## B. 研究方法

### 1. 解析対象蛋白質

(1) 2009-2011年に富山県で流行したA(H1N1)pdmのHA蛋白質三量体、(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、(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蛋白質四量体を解析対象とした。

### 2. 分子モデリング

HA蛋白質、NA蛋白質の機能構造モデル(多量体構造)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]。

モデリングの鑄型としては、以下のX線結晶構造を用いた。(1) 2009-2011年に富山県で流行したA香港型(H3N2)のHA蛋白質三量体モデル→PDB code: 1RVT 解像度2.50 Å [3]、(2) 2009年A香港型ワクチン原株・変異株のHA蛋白質モデル→PDB code: 2VIU解像度2.50 Å [4]、B型のワクチン原株・変異株のHA蛋白質→PDB code: 3BT6 解像度2.80 Å [5]、(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蛋白質四量体モデル→PDB ID: 3K39 解像度2.54 Å [6]。

### 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]。

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

(倫理面への配慮) 該当する事項は無い。

## References

- [1] *Science* 294: 93-96, 2001.
- [2] MOE. <http://www.chemcomp.com/>
- [3] *Science* 303:1838, 2004.
- [4] *J. Virol.* 82:3011-3020, 2008.
- [5] *Nat. Struct. Biol.* 5:119-123, 1998.
- [6] *J. Med. Chem.* 53: 6421-6431, 2010.

## C. 研究結果

### 1. 分子モデリング研究

(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。

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

分子動力学解析の実施環境の構築を進めた。この手法のウイルス研究への応用方法を調査し [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: 本研究では、任意の IFN 変異株の蛋白質立体構造情報を迅速に取得し、これを本体研究の推進に役立てることを目的として、ホモロジーモデリング法の応用研究を実施した。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、論文として採択され、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。ホモロジーモデリング法は、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。

(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、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、モデリングの鋳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、鋳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、本研究において、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た。

そこで本研究では、我々がこれまでに他のウイルスを対象に構築してきたモデリング環境を、IFV の構造解析に適用することとした。解析対象としては、エンベロープ蛋白質を選んだ。この蛋白質は、IFV の抗原性、免疫感受性、細胞・宿主指向性などの主要な決定領域であり、変異型ウイルスのリスク評価に重要である。検査やワクチンの有効性を維持するためにも、エンベロープ蛋白質の変異の情報は重要となる。研究代表者が求める“機能的構造変化”の解析に対応するために、HA 蛋白質、NA 蛋白質の多量体構造を解析した。さらに、ホモロジーモデリングの汎用性、迅速性を調べるために、広く IFV A, B 型の HA, NA 蛋白質の構造を解析し、実験結果との整合性を検討することとした。

その結果、本体研究で見出された変異はいずれも HA あるいは NA 蛋白質の相互作用表面に位置し、受容体や抗体への親