

- Cutter, J., Lin, R., Low, C., Mai, L. T. Q., Balish, A., Kile, J., Mei, S., McFarland, J., Moen, A., Olsen, S., Samaan, G., Xi, X., Chea, N., Diorditsa, S., Feldon, K., Fox, K., Jamsran, M., Konings, F., Lewis, H. C., McPherson, M., Nilles, E., Olowokure, B., Partridge, J. Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pacific Surveillance and Response (WPSAR) Journal* 4 51-59 2013
- Miyazaki, M., Nishihara, H., Hasegawa, H., Tashiro, M., Wang, L., Kimura, T., Tanino, M., Tsuda, M., Tanaka, S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441(4) 953-957 2013
- Kuroda M., Niwa, S., Sekizuka, T., Tsukagoshi, H., Yokoyama, M., Ryo, A., Sato, H., Kiyota, N., Noda, M., Kozawa, K., Shirabe, K., Kusaka, T., Shimojo, N., Hasegawa, S., Sugai, K., Tashiro, M., Oishi, M., Ishii, H., Kimura, H., Molecular evolution of the VP1 and VP3 genes in human rhinovirus species C *J. Virol.* 2013 submitted
- Barr, I. G., Besselaar, T. G., Cox, N. J., Daniels, R. S., Donis, R., Engelhardt, O. G., Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A., McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C., Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D., Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X., Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013-14) WHO recommendations for the viruses to be used in the 2013-14 Northern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. Vaccine 2014 in press
- World Health Organization /World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group: Bahl, J., Besselaar, T., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Cox, N., Claes, F., Davis, C. T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Guan, Y., Hamilton, K., Jang, Y., Kawaoka, Y., Kelso, A., McCauley, J., Mumford, E., Prajitno, T., Russell, C. A., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Shepard, S., Vijaykrishna, D., Webby, R., Webster, R., Wong, F. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza and other respiratory viruses* doi: 10.1111/irv.12230 2014 Epub ahead of print
- Kageyama, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Tashiro, M.

Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.
J. Virol. Methods 2013 submitted

Takashita, E., Ejimam, K., Itoh, R., Miura, M., Ohnishi, A., Nishimura, H., Odagiri, T., Tashiro, M.
A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013
EuroSurveill. 19(1) 2014

Tsunetsugu-Yokota, Y., KengoNishimura, K., Misawa, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H.L.K., MaiT.Q.Le, Dang, G.T., LongT.Nguyen, Tashiro, M., Kageyama, T.
Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.
J. Clin. Microbiol. 2014 submitted

WHO writing group of consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
Consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
WER 89 29-34 2014

WHO writing group of WHO external quality assessment programme (EQAP) for influenza viruses by polymerase chainreaction(PCR)

Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013
WER 89 37-44 2014

Shaw, I., Ciblak, M., Gabriel, G., Guthmann, J.-P., Heinz, F., Kunze, M., Kunze, U., Kyncl, J., Lina, B., Monto, A., Openshaw, P., Osterhaus, A., Prymula, R., Tashiro, M., Essen, T.V., Vanlangendonck, C., Ranst, M.V., Van-Tam, J.N.;Wagner, R.
Pandemic Influenza Preparedness: Key findings from a European survey.
Health Policy 2014 submitted

Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzaki, Y., Aina, A., Nakatsu, Y., Nagata, N., Kanou, K., Komase, K., Nobusawa, E., Maenaka, K., Kuroda, M., Hasegawa, H., Kawaokaj, Y., Tashiro, M., Takeda, M.
The host serine protease TMPRSS2 is essential for pathogenicity of influenza A virus.

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. 本研究で、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に貢献することができる。

2. これまでの遺伝子、抗原性変異のみの監視では検出不可能であった、ヒト型受容体変異を地球規模で直接監視する体制確立が可能となる。

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達成される。

4. 社会・経済機能を破綻させないためのインフルエンザ流行動向監視体制および事前準備の提言。

5. 万一、社会・経済機能が破綻した状況下での地域レベルでのインフルエンザ対策の提言。

6. 適切な投与方法を定めた抗インフルエンザ薬の使用指針の提言。

7. インフルエンザパンデミック対策における哺乳動物の公衆衛生学的重要性を発信し、対策を提言。

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

2009 年から 2010 年にかけて、ベトナムにてヒトおよび鳥から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスについて、ニワトリ肺線維芽細胞（DF-1）、ヒト II 型肺胞上皮培養細胞（A549）における増殖性の比較を行った。その結果、DF-1 細胞では効率よく増殖するが、A549 細胞では増殖性に差が認められた。A549 細胞での増殖性が高いヒト分離株、A549 細胞での増殖性が低い鳥分離株を用いて解析を行った結果、両株の増殖の差に関与する 3 つのアミノ酸を特定した。本研究で明らかになったアミノ酸は、分離された H5N1 ウイルスのリスク評価を行う上で、マーカーとして利用できる可能性がある。

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

2009 年から 2010 年にかけて、ベトナムにてヒトから分離された 8 株、および鳥から分離された 2 株、計 10 株の H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて、ニ

ワトリ肺線維芽細胞（DF-1）、ヒト II 型肺胞上皮培養細胞（A549）における増殖能を比較解析した。

さらに、ヒトの細胞で増えやすい株と増えにくい株の増殖性の違いに関与する変異を解析した。

（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 DF-1 細胞では、解析した 10 株とも効率よく増殖したのに対し、A549 細胞では増える株と増えない株に顕著な差が認められた。
- ② 本研究は、ヒト細胞における高増殖性に

関わり、まだ同定されていないアミノ酸を特定することが主眼である。したがって、哺乳動物細胞、及びヒトの細胞における高増殖性に関わることが報告されているアミノ酸配列を持たず、A549細胞で効率よく増殖する株に注目することにした。PB2の627番目、591番目、701番目、270番目、158番目のアミノ酸は哺乳動物細胞での高増殖性に関与することが知られている。そこで、これらのアミノ酸を持たず、A549細胞で効率よく増殖したヒト分離株、A549細胞で増殖しにくかった鳥分離株の遺伝子配列を比較することで、2株間の増殖の差に関わるアミノ酸配列の特定を試みた。

- ③ ヒト分離株、鳥分離株の遺伝子を元に、組み換えウイルスを作成した。組み換えウイルスのA549細胞における増殖を観察することで、PB2セグメントが2株間の増殖の差に、最も関わっていることを示した。更に、数種類のPB2キメラを作成し増殖を比較することで、PB2の中で最も増殖に関与している部分を特定した。最後に、PB2遺伝子に点変異を入れた変異ウイルスを作成し、A549細胞における増殖を比較することで、2株間の増殖の差に関わる3つのアミノ酸を特定した。
- ④ 3つのアミノ酸のうちの1つは単独変異で2株間の増殖に関与する。残り2つのアミノ酸は同時に持てば、鳥分離株のA549細胞における効率よい増殖に寄与することが明らかとなった。
- ⑤ Online上のデータベースに掲載されている様々な亜型、宿主の分離株がこれらのアミノ酸を持つかどうか検証した結果、1つのアミノ酸はH5N1ウイルスを含め、殆どのインフルエンザウイルス株で高率に保存されており、ヒトへの適応

に関わっている可能性は低いと考えられた。一方で、別の1つのアミノ酸は2006年以降に分離された季節性H3N2インフルエンザウイルスの30%超で保存されており、ヒトへの適応に関わっている可能性があることが示唆された。

D. 考察

本研究で明らかとなったアミノ酸は、分離されたH5N1ウイルスのリスク評価を行う上で、マーカーとして使用できる可能性がある。

現在までの実験で、ウイルスの増殖の観察をする際、すべて37°Cの環境下で行ってきたが、今後はヒトの上気道の33°Cでも観察する予定である。

E. 結論

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの、ヒト細胞における効率の良い増殖に関与するアミノ酸を新たに特定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko Y, Takimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. *Vaccine* 31:6239-6246, 2013.

Sugita Y, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y. The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. *J Virol* 87:12879-12884, 2013.

Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y. The genome packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome bundling signal. *J Virol* 87:11316-11322, 2013.

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501:551-555, 2013.

Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. *J Virol* 87:7874-7881, 2013.

Kiso M, Takano R, Sakabe S, Katsura H, Shinya K, Uraki R, Watanabe S, Saito H, Toba M, Kohda N, Kawaoka Y. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Sci Rep* 3:1563, 2013.

Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* 87:2455-2462, 2013.

2. 学会発表

山地玲奈、山田晋弥、河岡義裕「H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応に関与するアミノ酸変異の同定」Third Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2014 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

－喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製－

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：川口 晶(国立感染症研究所 感染病理部 協力研究員)

鈴木 忠樹(国立感染症研究所 感染病理部 室長)

研究要旨： 呼吸器ウイルス感染症は気管支喘息の重大な増悪因子になると考えられており、喘息はインフルエンザの重症化因子である可能性が指摘されている。しかし、インフルエンザウイルス感染時の喘息発作の病態とその形成機序については不明な点が多い。本研究は喘息モデル動物を用いて喘息発作とインフルエンザウイルス感染との関係性を明らかにすることを目的とした。その結果、喘息発作とウイルス感染の生じるタイミングが、喘息とインフルエンザウイルス肺炎の重症度に重要であることが明らかになった。

A. 研究目的

2009 年の新型インフルエンザ(H1N1pdm09)では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向があったことが指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度に関わらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかになってきた。しかしながら、喘息患者でのインフルエンザ重症化の病因・病態については全く分かっていない。本研究は気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザウイルス感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明することを目指した。

一般的に喘息と呼吸器ウイルス感染症の関係性については、(1)気管支喘息の発症因子としての呼吸器ウイルス感染症、(2)喘息発作誘発因子としての呼吸器ウイルス感染症、(3)呼吸器ウイルス感染症により惹起される病態の悪化と喘息、という主に三つの観点から研究が進んでいる。このような研究には目的に合わせて適切な動物モデルを選択する必要があるが、本研究では気管支喘息モデル動物として、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルであ

る NC/Nga マウスを用いた。このマウスを用いた OVA 感作気管支喘息モデルでは BALB/c マウスに比べ血中 IgE の上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことから、気管支喘息の良い疾患モデルとして知られている。我々は、これまでに、このマウスを用いて、マウスに馴化させた新型インフルエンザウイルス Narita 株をこのマウスに感染させる実験を行い、更にモデル抗原を用いた気管支喘息マウスモデルの構築を行った。さらに、喘息発作と感染との関係性を明らかにするために、ウイルス感染と喘息発作を組み合わせた動物モデルを作製し、病理学的および免疫学的に解析したところ、喘息発作とウイルス感染の生じるタイミングが、喘息とインフルエンザウイルス肺炎の重症度に重要であることが明らかになってきた。本年度は、さらに詳細に解析を進めるために感染および喘息発作誘発後経時的にサンプルを採取し、免疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1) 気管支喘息モデルの構築と感染実験

6~8 週齢の NC/Nga マウスまたは BALB/c マウスに卵白アルブミン(OVA) 100 μ g + alum 2mg / 200 μ l PBS を1週間間隔で2回腹腔内投与した。

感染後喘息発作モデルにおいては、OVA 最終投与から1週間後に Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。接種ウイルス量は、40 LD₅₀に相当する。Narita 株はBALB/c マウスの肺内にて15代継代しマウスに馴化させた株を用いた。対照群には、ウイルスを接種していない有精卵(10日卵)の漿尿液を接種ウイルス液と同程度に希釈したものを用いた。続いて気管支喘息発作を誘発するためにウイルス接種1日後と2日後にOVA 100 μ g / 20 μ l PBS を経鼻投与した。対照群にはPBSのみを投与した。ウイルス接種1日後と2日後、および3日後(最後のOVA 経鼻投与から24時間後)にこれらの動物を過麻酔殺し、肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80 $^{\circ}$ Cに保管した。また、体重減少率の測定実験には、感染後21日目まで観察を行った。喘息発作後感染モデルにおいては、OVA 最終投与から1週間後に2日連続でOVA 100 μ g / 20 μ l PBS をケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。最終のOVA 経鼻投与24時間後に Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。OVA 投与後1日後、2日後、4日後(それぞれウイルス感染0日後、1日後、3日後)に、これらの動物を過麻酔殺し肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。そ

の後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80 $^{\circ}$ Cに保管した。また、体重減少率の測定実験には、感染後21日目まで観察を行った。これらの動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2) 肺洗浄液(BALF)細胞数計測

BALF 中の総細胞数を Vetscan を用いて計測した。各細胞種はBALFをCytoSpin 4 Cytocentrifuge (Thermo)を用いてガラス上に密着させギムザ染色およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、正立顕微鏡BX43(オリンパス)を用いて計測した。

3) ケモカインの定量

BALF 中のケモカインは Mouse Cytokine 20-Plex Antibody Bead Kit (Invitrogen)を用いてプロトコールに従いサンプル処理を行い、LUMINEX システムにて計測を行った。

4) ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を200 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ Cの培養器内で1時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して37 $^{\circ}$ Cで40時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

C. 研究結果

1) 気管支喘息モデルを用いたウイルス感染

感染後喘息発作モデルにおいて、非感染群においては、有意な体重減少は観察されなかったが、

感染群においては、喘息発作群および非喘息発作群のいずれにおいても体重減少がみられた。さらに、感染後に OVA を負荷した感染後喘息発作群の動物においては、感染後3日目の時点で、明らかな立毛と元気消失を認め、感染後非喘息発作群に比べ有意な体重減少の増悪が観察され、病態悪化が見られた。一方、喘息発作後感染モデルにおいては、感染群、非感染群のいずれの動物も感染後3日目の時点では明らかな立毛、元気消失は見られなかった。さらに喘息発作後感染群と非喘息発作後感染群を比較すると、喘息発作後感染群の体重減少率は有意に低下しており、病態の改善が見られた。

2) BALF 中炎症細胞の計測

感染後喘息発作モデルにおいて、感染後、経時的に採取した BALF 中に認められた炎症細胞を種類毎に計測したところ、ウイルス感染後に喘息発作を誘発(感染後喘息発作群)すると、感染後非喘息発作群にくらべると BALF 中の好中球数は同程度であるが、好酸球数が有意に増加した。また、非感染喘息発作群に比べると、BALF 中の好酸球数は有意に減少したが、好中球数が有意に増加した。

次に喘息発作後感染モデルにおいて、感染後、経時的に採取した BALF 中に認められた炎症細胞を種類毎に計測したところ、喘息発作後感染群は、喘息発作後非感染群に比べると好酸球数は同程度であるのに対し、好中球数が有意に増加していた。一方、喘息発作後感染群は、非喘息発作感染群と比べると好中球数が同程度であるのに対し、好酸球数が増加していた。

これらの結果をまとめると、症状の悪化を伴わない喘息発作後感染モデルにおいては、好中球数は感染群間で差がなく、好酸球数は喘息発作群間で

差がなかったのに対して、症状の悪化を伴う感染後喘息発作モデルにおいては、好中球数は感染群間で差がなかったのにも関わらず、喘息発作群の好酸球数が感染を伴う場合には有意に低下しており、症状悪化を伴う感染後喘息発作群では、好酸球増加の程度が非感染喘息群や喘息群感染群に比べ、低く抑えられていることが明らかになった。

3) BALF 中のケモカインの計測

感染後、経時的に採取した BALF 中のケモカインを定量したところ、感染後喘息誘発モデルにおいては、MIP-1/CCL3、IP-10/CXCL10、KC、MCP-1/CCL2は感染後喘息発作群で最も高い傾向が見られた。なかでも、MCP-1/CCL2は、感染後に時間が経過するに従って増加しており、病態と最も関連していると考えられた。一方、喘息発作後感染モデルにおいては、いずれのケモカインも喘息発作群において有意に低かった。

4) BALF 中のウイルスタイトターの計測

次に BALF 中のウイルス量をプラークアッセイにより定量した所、感染後喘息発作モデルにおいては、喘息発作群と非発作群で明らかな差は認められなかった。しかしながら、喘息発作後感染モデルにおいては、喘息発作群において有意にウイルスタイトターの減少が見られた。

D. 考察

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルであるNC/Ngaマウスを用いたOVA感作気管支喘息モデルではBALB/cマウスに比べ血中IgEの上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことが知られ

ることから、気管支喘息のよい疾患モデルとされている。本研究ではこの気管支喘息モデルを用いてインフルエンザウイルス感染が喘息発作を悪化させるかどうか、検討を行った。この動物モデルにおいて経時的にウイルス学的、免疫学的に解析を進めたところ、ウイルス感染後、喘息発作を誘導した場合には、感染3日後のBALF中で好中球数、好酸球数が有意に上昇し、MIP-1/CCL3、IP-10/CXCL10、KC、MCP-1/CCL2、などのケモカインの産生量が高くなっており、体重減少率が増悪し病態が悪化していると考えられた。しかしながら、BALF中のウイルス量には差が認められず、ウイルス性肺炎が悪化したとは考えにくく、喘息発作の増悪化が考えられた。一方、喘息発作を誘導後にインフルエンザウイルスを感染させると、感染3日後までのBALF中のウイルス量は喘息発作を誘導した場合に有意に減少していた。ケモカインの産生も、喘息発作を誘導した場合に減少し、感染後に喘息発作を誘導した場合とは逆に減少しており、体重減少率も軽快し、ウイルス性肺炎が軽快したと考えられた。以上の結果から、インフルエンザウイルス感染後に喘息発作が起きた場合に症状の増悪が認められ、病態の悪化には種々のケモカインが関与していることが示唆された。また、病態増悪とBALF中のMCP-1産生量に正の相関が認められたことから、喘息発作によるインフルエンザ感染症の重症化の指標としてBALF中のMCP-1測定が有用である可能性が示唆された。

過去に喘息モデル動物にインフルエンザウイルスを感染させる研究は行われているが、インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化モデルの報告はされていない。本モデルはインフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新しい

動物モデルになることが考えられた。

E. 結論

アレルギー素因を有するNC/Ngaマウスを用いてインフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築した。本モデルではウイルス感染後の喘息発作により喘息の増悪が認められた。一方、ウイルス感染前の喘息発作により、ウイルス感染は抑制され炎症の程度も低くなった。これらの結果から喘息発作とウイルス感染の生じるタイミングが、喘息とインフルエンザウイルス肺炎の重症度に重要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 2) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 3) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S,

- Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):551-5. doi: 10.1038/nature12392.
- 4) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- 5) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e68375.
- 6) Dan K, Akiyoshi H, Munakata K, Hasegawa H, Watanabe K. A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM-CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. *Pharmacology*. 2013;91(5-6):314-21.
- 7) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 8) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2013 Mar;26(3):357-69.
- 9) 長谷川 秀樹, 田村 慎一 インフルエンザに立ち向かうインフルエンザワクチンの現状と展望 *Mebio(0910-0474)30 巻 12 号 Page68-73* 2013.12
- 10) 長谷川 秀樹 今、注目のワクチン 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン *ファルマシア (0014-8601)49 巻 3 号 Page196-200* 2013.03
- 11) 長谷川 秀樹 ワクチン対策の現状と課題 インフルエンザワクチン 化学療法の領域 (0913-2384)29 巻 2 号 Page230-234 2013.01
2. 学会発表
- 1) 長谷川 秀樹 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン (Intranasal Influenza Vaccine as a vaccine for next generation) 第

- 86 回日本細菌学会総会(幕張)2013 年 3 月
- 2) 岡田 清吾, 長谷川 俊史, 長谷川 秀樹, 相内 章, 池本 健三, 佐々木 功典, 戸田 昌一, 調 恒明, 市山 高志 インフルエンザ A/H1N1 2009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学術集会(広島)2013 年 4 月
 - 3) 長谷川 秀樹: ワクチン研究の最前線 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチンの開発. 日本薬剤学会 第 28 年会(名古屋) 2013 年 5 月
 - 4) 宮崎 将也, 王 磊, 長谷川 秀樹, 津田 真寿美, 西原 広史, 田中 伸哉: ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析. 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 - 5) 中島 典子, 佐藤 由子, 片野 晴隆, 長谷川 秀樹: 感染病理学の新展開 新しい迅速 in situ ゲノム検出法の感染病理への応用. 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 - 6) 片野 晴隆, 佐藤 由子, 中島 典子, 福本 瞳, 鈴木 忠樹, 黒田 誠, 長谷川 秀樹 感染病理学の新展開 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 - 7) 長谷川 秀樹, 中島 典子 炎症・免疫機構の新基軸と疾病の病理 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ 剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
 - 8) 長谷川 秀樹: 良く効くインフルエンザワクチンを目指して. 第 54 回日本臨床ウイルス学会(倉敷)2013.年 6 月
 - 9) 長谷川 俊史, 岡田 清吾, 脇口 宏之, 市山 高志, 長谷川 秀樹, 相内 章, 調 恒明, 戸田 昌一, 熱田 了 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性インフルエンザの比較 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌)2013 年 10 月
 - 10) 脇口 宏之(山口大学 大学院医学系研究科小児科学分野), 岡田 清吾, 長谷川 秀樹, 相内 章, 戸田 昌一, 調 恒明, 長谷川 俊史 気管支喘息(病態)・免疫不全 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会(札幌)2013 年 10 月
 - 11) 長谷川 秀樹, 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 浅沼 秀樹, 小田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅 高病原性鳥インフルエンザウイルス A (H5N1) 全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津)2013 年 11 月
 - 12) 鈴木 忠樹, 川口 晶, 相内 章, 田村 慎一, 小田切 孝人, 田代 真人, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津)2013 年 11 月
 - 13) 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 小田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅, 長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢, 性別あるいは副反応が与える影響 第 17 回日本ワクチン学会学術集会(津) 2013 年 11 月
 - 14) 渡辺 登喜子, 今井 博貴, 村上 晋, 中島 典

- 子、富田 有里子、山西 誠也、浦木 隆太、西藤 岳彦、内田 裕子、長谷川 秀樹、田代 真人、河岡 義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 15) 中島 典子、佐藤 由子、片野 晴隆、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 16) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅沼 秀樹、梁 明秀、長谷川 秀樹 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 17) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠樹、田村 慎一、荒尾 雄二郎、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 18) 相内 章、浅沼 秀樹、鈴木 忠樹、原田 勇一、田村 慎一、田代 真人、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 19) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの炸裂 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年

11 月

国際学会

- 1) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Elly van Riet, Shi-ichi Tamura, Kazuyuki Ikeda, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Takeshi Kurata. ANTIBODY RESPONSES IN SERUM AND NASAL MUCUS INDUCED BY THE INTRANASAL VACCINATION WITH A WHOLE-VIRION INACTIVATED VACCINE OF A(H5N1)VIRUS IN HEALTHY NAÏVE HUMAN ADULTS. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 2) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. ANTIBODY RESPONSES INDUCED BY INTRANASAL VACCINATION OF A WHOLE INACTIVATED INFLUENZA VIRUS IN MICE PREVIOUSLY INFECTED OR VACCINATED. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 3) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. IMPACT OF THE QUATERNARY STRUCTURE OF HUMAN SECRETORY-IGA ON NEUTRALIZATION POTENCY TO INFLUENZA A VIRUS IN UPPER RESPIRATORY TRACT. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. Keystone Colorado

USA, January 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

2. 実用新案登録

なし

鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの 抗インフルエンザ薬感受性に関する研究

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、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、伊東玲子、三浦舞、
今井正樹、岸田典子、菅原裕美、佐藤彩、土井輝子

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

研究要旨

中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9) は、発生から 1 年近く経った現在も依然としてヒトへの感染例が報告されている。日本国内においても鳥インフルエンザ A(H7N9) の流行に備えた事前準備が必要である。そこで、日本国内で使用されている抗インフルエンザ薬について、A(H7N9) ウイルスの感受性を調べた。その結果、中国でヒトから分離された A(H7N9) ウイルスは、4 種類の NA 阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）すべてに対して感受性を示し、治療効果が期待されることが明らかになった。一方で、すべての NA 阻害剤に対して感受性の低下を示す A(H7N9) ウイルスも検出され、耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握するために、継続的に耐性ウイルスの監視を行う必要性が示唆された。また、耐性ウイルスの監視に際しては、表現型解析と遺伝子型解析の両方を並行して実施することで、耐性ウイルスを見逃す危険性を回避できることが示された。

A. 研究目的

中国で 2013 年 3 月に世界で初めてヒトへの感染が確認された鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスは、現在も中国を中心にヒトへの感染が続いており、報告数は 200 例を超えている。日本国内においても鳥インフルエンザ A(H7N9) の流行に備えた事前準備が必要である。日本国内においてインフルエンザの予防および治療には主に、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 NA 阻害剤、オセルタミビ

ル（商品名タミフル）、ペラミビル（商品名ラピアクタ）、ザナミビル（商品名リレンザ）、ラニナミビル（商品名イナビル）が使用されている。鳥インフルエンザ A(H7N9) パンデミック発生時の治療方針を定めるためには、A(H7N9) ウイルスの抗インフルエンザ薬に対する感受性の確認が不可欠である。そこで本研究では、日本国内で使用されている 4 種類の NA 阻害剤について、A(H7N9) ウイルスの感受性を調べた。

B. 研究方法

中国でヒトから分離されたA(H7N9) ウイルスについて、MUNANA基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ペラミビル、ザナ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、A(H7N9) ウイルスのNA遺伝子全長シーケンスを行い、既知の薬剤耐性変異の検索を行った。

C. 研究結果

中国でヒトから分離されたA(H7N9) ウイルス、A/Anhui/1/2013およびA/Shanghai/1/2013についてオセルタミビル、ペラミビル、ザナ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た。その結果、両ウイルスはすべての薬剤に対して感受性を示した。一方、両ウイルスのNA遺伝子について全長シーケンスを行った結果、A/Anhui/1/2013は既知の薬剤耐性変異をもっていなかったが、A/Shanghai/1/2013は既知の薬剤耐性変異R292Kをもつことが明らかになり、表現型と遺伝子型の結果が一致しないことが明らかになった。そこで、A/Shanghai/1/2013について、プラーククロニングによりウイルスの単離を行ったところ、A/Shanghai/1/2013は、R292K耐性変異ウイルスと野生型ウイルスの混合ウイルスであることが明らかになった。そこで改めて、単離されたR292K耐性変異ウイルスと野生型ウイルスについて、それぞれオセルタミビル、ペラミビル、ザナ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、野生型ウイルスはすべての薬剤に対して感受性を示したが、R292K耐性変異ウイルスはすべての薬剤に対して感受性の低下を示すことが明らかになった。

D. 考察

中国で発生した鳥インフルエンザA(H7N9)は、中国を中心にヒトへの感染が続いており、香港、台湾、マレーシアでも報告されている。日本国内で鳥インフルエンザA(H7N9)パンデミックが発生した場合には、4種類のNA阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）すべてについて、治療効果が期待される。しかし、すべての薬剤に対して感受性が低下するR292K変異ウイルスの出現に注意が必要である。また、耐性ウイルスの監視に際しては、表現型解析と遺伝子型解析の両方を並行して実施することで、耐性ウイルスを見逃す危険性を回避できることが示された。

E. 結論

中国でヒトから分離されたA(H7N9)ウイルスは、日本国内でインフルエンザの予防および治療に使用されている4種類のNA阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）すべてに対して感受性を示し、治療効果が期待されることが明らかになった。一方で、NA蛋白にR292K変異をもち、すべてのNA阻害剤に対して感受性の低下を示すA(H7N9)ウイルスも検出され、耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握するためには、継続的に耐性ウイルスの監視を行う必要があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

E. Takashita, S. Fujisaki, N. Kishida, H. Xu, M. Imai, M. Tashiro, T. Odagiri and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated

in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan.

Influenza and Other Respiratory Viruses, 7, 1390–1399, 2013

T. Watanabe, M. Kiso, S. Fukuyama, N. Nakajima, M. Imai, S. Yamada, S. Murakami, S. Yamayoshi, K. Iwatsuki-Horimoto, Y. Sakoda, E. Takashita, R. McBride, T. Noda, M. Hatta, H. Imai, D. Zhao, N. Kishida, M. Shirakura, R. P. de Vries, S. Shichinohe, M. Okamatsu, T. Tamura, Y. Tomita, N. Fujimoto, K. Goto, H. Katsura, E. Kawakami, I. Ishikawa, S. Watanabe, M. Ito, Y. Sakai-Tagawa, Y. Sugita, R. Uraki, R. Yamaji, A. J. Einfeld, G. Zhong, S. Fan, J. Ping, E. A. Maher, A. Hanson, Y. Uchida, T. Saito, M. Ozawa, G. Neumann, H. Kida, T. Odagiri, J. C. Paulson, H. Hasegawa, M. Tashiro and Y. Kawaoka. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*, 501, 551–555, 2013

Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*, 9, 1962–1970, 2013

N. Kishida, M. Imai, H. Xu, K. Taya, S. Fujisaki, E. Takashita, M. Tashiro and T. Odagiri. Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Japanese journal of infectious diseases*, 66, 549–551, 2013

Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance Response System, Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Yu H, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood P, Lucero M, Roque V Jr, Lee Suy L, Cardon P, Tandoc A 3rd, Olveda RM, Kang C, Young-Joon P, Cutter J, Lin R, Low C, Mai le TQ, Balish A, Kile J, Mei S, McFarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xiyan X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J. Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pac Surveill Response J*, 4, 51–59, 2013

E. Takashita, M. Ejima, R. Itoh, M. Miura, A. Ohnishi, H. Nishimura, T. Odagiri and M. Tashiro. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro surveillance*, 19, 20666, 2014

2. 学会発表

高下恵美、小田切孝人：5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54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月

E. Takashita, M. Ejima, S. Fujisaki, N. Kishida, H. Xu, M. Imai, M. Tashiro, T. Odagiri : A cell-based screening system

to evaluate the susceptibility of influenza viruses to T-705 (favipiravir).
15th International Negative Strand Virus Meeting, June 2013

E. Takashita, S. Fujisaki, N. Kishida, H. Xu, M. Imai, M. Tashiro, T. Odagiri :
Detection of antiviral-resistant influenza viruses in Japan during pandemic and post-pandemic periods.
Options for the Control of Influenza VIII, September 2013

高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小田切孝人：ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつA(H7N9)およびA(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月

藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、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：2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11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

鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出系の構築 ならびに国内検査体制の整備

研究分担者 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室長
研究協力者 高山郁代：同上 研究員
高橋 仁：同上 主任研究官
中内美名：同上 主任研究官

研究要旨 中国での鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのヒトへの初感染例の報告を受け、real-time RT-PCR 法を用いたユーラシア系統 H7 亜型ウイルスに対する高感度かつ特異的な HA 遺伝子検出系を迅速に構築した。本検出系は、全国地方衛生研究所ならびに検疫所へ検査用試薬や陽性コントロールとともに配布にされ、直ちに日本全国で H7N9 ウイルスに対する核酸検出検査が可能な体制が整えられた。

A. 研究目的

平成 25 年 3 月 31 日に中国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのヒトへの初感染例が報告された。その後 8 月までに 135 例の症例が報告されたが、4、5 月をピークに症例数は減り、9 月には 0 となった。しかし、10 月になり再び感染例が報告されるようになると、平成 25 年 10 月から平成 26 年 2 月までの間に、230 例以上の症例が報告されるようになった。症例報告のあった感染者の多くは急性呼吸促迫症候群(ARDS)を発症し死亡例も多い。台湾やマレーシアでは中国からの輸入感染例が報告されており、日本でも感染者が発見される可能性がある。

平成 25 年 6 月 7 日に改定された「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」では、新型インフルエンザが海外で発生した場合に、国内発生に備えてサーベイランス体制を強化する事が対策の一つとなっており、「国立感染症研究所において、新型インフ

ルエンザ等に対する PCR 等の検査体制を確立する。」とも明示されている。

本研究では、全国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの核酸検出検査を可能にするため、real-time RT-PCR 法を利用した検出系の構築と全国地方衛生研究所ならびに検疫所での検査体制の整備を行ったので報告する。

B. 研究方法

中国で初感染事例の報告と同時に鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの全長シーケンスが公開された。このシーケンスを元に、real-time RT-PCR法を利用した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築を試みた。中国で分離された鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスを入手するまでには時間を要することから、新型インフルエンザウイルス系統調査・保存事業で当センターに集められたウイルスライブラリーの中

から、real-time RT-PCR法を利用した鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の陽性コントロールとして使用可能かどうか、国内で分離された3株のH7亜型鳥インフルエンザウイルスを選んで塩基配列の解読およびHA遺伝子配列を比較した相同性の解析を行った。その結果、A/duck/Fukui/1/2004(H7N7)が、中国で分離されたH7N9ウイルスのHA遺伝子配列と相同性が高いたことが判明し、このウイルスを陽性コントロールに利用できるreal-time RT-PCR法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の構築を進めた。

Real-time RT-PCR 検出系の構築にあたっては、データベースから入手可能なユーラシア系統 H7 亜型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列に対するアライメントを作成し、H7 亜型内で保存されている領域をターゲットとしたプライマーおよびプローブの設計を行った。

設計した検出系の検出感度、特異性などについての検討は、A/duck/Fukui/1/2004(H7N7)ウイルスより抽出した RNA を使用し、非特異的反応について評価検討は、他の亜型・型のインフルエンザウイルスならびに各種呼吸器感染症ウイルスから抽出した核酸を用いた。最終的に検出感度、特異性などの評価確認については、平成 25 年 4 月 10 日に中国 CDC より入手した A/Anhui/1/2013(H7N9)ウイルスから抽出した RNA を用いて検討した。

一方、検査で使用する陽性コントロールは、A/duck/Fukui/1/2004 ウイルス RNA の M 遺伝子の濃度を 1.8×10^7 copies/tube に調整してキャリア RNA を加えた上で、凍結真空乾燥を行い、乾燥時の劣化がないことを確認してから、全国の地方衛生研究所および検疫所へ配布した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. H7 亜型 HA 遺伝子検出系の構築

今回構築したユーラシア系統 H7 亜型 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブの配列は、次の通りである。

Forward primer : TGTGATGAYGAYTGYATGGCCAG、Reverse primer : ACATGATGCCCCGAAGCTAAAC、Probe : (FAM)ATCTGTATTCTATTTTGCATTGCYTC(MGB)

検出感度の検討を行ったところ、本検出系は検出限界が数 copies/reaction であり非常に高感度だった。また、H7 亜型以外の型・亜型のインフルエンザウイルスから抽出した RNA および他の呼吸器系ウイルスから抽出した核酸を使用して、特異性および非特異反応について確認を行ったところ、H7 亜型以外の型・亜型および他のウイルスに対する交差反応は見られず、本検出系は特異性が高いことが示された。

2. 検査関連の対応

4 月 12 日に当所より全国 74 カ所の地方衛生研究所および 16 カ所の検疫所へ陽性コントロールを送付した。また、4 月 15 日に試薬メーカーから遺伝子検査用試薬、プライマー、プローブを直送し、遅くとも翌日には全国の地方衛生研究所および検疫所への検査キット配布を完了した。また、同日「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 1 版)」を地方衛生研究所へメーリングリストにて送付した。これにより全国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの核酸検出検査を実施できる体制が整備された。

その後も、遺伝子検査時に陽性コントロール由来のコンタミネーションを区別できる陽性コントロールを作製して再配布を行うなど更なる検査体制の強化を行った。