

T.Kageyama, S.Fujisaki, E.Takashita, H.Xu, S.Yamada, Y.Uchida, G.Neumann, T.Saito, Y.Kawaoka and M.Tashiro. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro surveillance*, 18, 20453,2013

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

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, RP.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, AJ.Eisfeld, G.Zhong, S.Fan, J.Ping, EA.Maher, A.Hanson, Y.Uchida, T.Saito, M.Ozawa, G.Neumann, H.Kida, T.Odagiri, JC.Paulson, H.Hasegawa, M.Tashiro and Y.Kawaoka. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*, 501,551-555,2013

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

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

R.Uraki, M.Kiso, K.Iwatsuki-Horimoto, S.Fukuyama, E.Takashita, M.Ozawa, Y.Kawaoka : A PB2-KO influenza virus-based bivalent vaccine protects mice against pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenge. 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：小児における抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの検出 第45回日本小児感染症学会学術集会、2013年10月

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、田代眞人、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、田代眞人、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

高下恵美：インフルエンザウイルスのファビピラビル（T-705）感受性 3rd Negative Strand Virus-Japan、2014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

遺伝情報からウイルスのリスクを予測する方法の研究

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、新型インフルエンザウイルス（IFV）の遺伝情報から蛋白質立体構造情報を抽出し、ウイルスのリスクを予測する新しい方法を研究する。成果を本体研究に提供し、危機管理に役立てる。本年度は、札幌の IFV A (H1N1)pdm09 薬剤耐性株、及び中国のトリ IFV A (H7N9) について、外被蛋白質の構造特性の観点からリスクを評価した。その結果、(i) H1N1pdm09 薬剤耐性株 NA 蛋白質の特徴的な変異 (N386K) は NA 蛋白質を不安定にすること、したがって薬剤耐性株が 386K 変異をもたない感受性株より速やかにヒトに拡散するリスクは低いことを示唆した。また、(ii) A (H7N9) 中国株のヒト-ヒト伝播効率を高める可能性のある HA 変異を 58 種予測し、その後散発的に発生したウイルスはこれらの変異をもたないこと、したがって現時点では大規模な拡散のリスクは低いことを示唆した。平成 26 年 2 月上旬までの (H1N1)pdm09 耐性株と A (H7N9) 中国株の拡散状況は、これらのリスク評価を支持している。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス（IFV）対策は、国際社会の主要課題と位置づけられる。新たな変異ウイルスについて速やかにリスクを評価し、危機管理に生かす必要がある。また、新型ウイルスのヒト伝播効率を高める変異を事前に把握して流行に備えることが重要となる。しかし新型ウイルスについては、しばしば分離ウイルスを入手できず、実験室レベルでのウイルスの解析が難しい。そこで分離ウイルスに依存しないリスク評価法を常備して危機管理を補完することが重要となる。

ウイルスのリスクを決める重要な因子はウイルス蛋白質である。特に、ウイルス粒子表面に存在する HA、および NA 蛋白質は、リスク評価において以下の点から重要である。①宿主指向性を決める（トリ→ヒト感染のリスク）、②感染伝播能を決める（ヒト→ヒト感染買う代のリスク）、

③薬剤・ワクチンの標的となる（有効性減弱のリスク）。いずれにおいても、蛋白質の構造特性がどのように変化するかを知ることが、リスク評価の鍵を握る。しかし、個々の変異蛋白質について X 線結晶構造解析などの実験的手法を用いて構造情報を集めると膨大な時間がかかる。緊急時に要求される迅速性を満たすことは不可能である。

近年、生体分子の構造と振る舞いをコンピュータにより近似する技術が急速に進歩している。2013 年度のノーベル化学賞は、この計算科学の先駆者が受賞した。我々は約 10 年前に計算科学の重要性に着目し、解析基盤を整備して変異ウイルスの蛋白質の構造解析に応用して来た。これにより、計算科学はウイルスの複製、薬剤耐性、免疫逃避、宿主指向性などの性質変化の解析に極めて有用であることを立証してきた。構造情報を入手することで、変異ウイルスの性質変化を分子レ

ベルで理解するだけでなく、性質変化をもたらす未知の変異を予測することも可能になりつつある。そこで本研究では、計算科学を用いて蛋白質構造を解析し、
新型ウイルス等のリスク評価に役立つ情報を抽出し、
本体研究に提供して危機管理に役立てることとした。

B. 研究方法

(1) HA 蛋白質、NA 蛋白質の配列情報
A(H7N9) HA 蛋白質、H1N1pdm09 NA 蛋白質の配列情報は、研究代表者より入手した。

(2) 分子モデリング
HA 蛋白質、NA 蛋白質の立体構造は、ホモロジーモデリング法を用いて構築した。モデリングは、Molecular Operating Environment (MOE) の‘MOE-Align’ と‘MOE-Homology’を用いた。H1N1pdm09 NA モデリングの鋳型には H1N1pdm09 NA 結晶構造 (PDB code:4B7R、解像度 1.9 Å)、A(H7N9)HA-シアル酸複合体モデリングの鋳型には A(H7N7)HA 結晶構造 (PDB code:4DJ6、解像度 2.61 Å) を用いた。

(3) 構造安定性の解析
構造安定性の解析は、MOEの‘Protein Design Application’を用いた。HA三量体境界面周辺、あるいはNA蛋白質の残基386など、特定のアミノ酸を置換し、もとの残基の自由エネルギーとの差 ($\Delta\Delta G$: kcal/mol) を計算した。 $\Delta\Delta G$ を構造安定性の変化の指標とした。

(4) 受容体指向性の解析
受容体指向性の解析も‘Protein Design Application’を用いた。A(H7N9)HA 蛋白質とヒト型受容体の一部 (SA α 2, 6-Gal β 1-4GlcNAc)、あるいはトリ型受容体の一部 (SA α 2, 3-Gal β 1-4GlcNAc) との複合体モデルを構築し、受容体結合部位周辺のアミノ酸を置換し、 $\Delta\Delta G$ を指標として構造安定性が昂進するアミノ酸を包括的に探索した。

(倫理面への配慮)

該当する事項は無い。

C. 研究結果

(1) IFV A(H1N1)pdm09 札幌耐性株の NA 蛋白質の構造解析 (図 1)

平成 25 年 11-12 月、札幌でオセルタミビル/ベラミビル耐性株が 6 株検出された (散発例)。同株は、全て NA 蛋白質に既知の H275Y 耐性変異をもち、分離ウイルスもオセルタミビル/ベラミビル耐性を示した。さらに、NA 蛋白質の安定性を昂進することでウイルスの伝播能を向上しうるとの報告がある部位が、未報告のアミノ酸に変異していた (N386K)。そこで、N386K 変異の構造安定性への影響を解析し、伝播能向上のリスクを考察することで、札幌耐性株の危機管理に資することとした。

アミノ酸置換前後の $\Delta\Delta G$ を指標として変異による NA 構造安定性の変化を調べた。その結果、札幌耐性株に見られるリジン残基を H1N1pdm09 感受性株に見られるグルタミン、あるいはオーストラリアの H1N1pdm09 薬剤耐性株に見られるセリンに置換すると $\Delta\Delta G$ が顕著に増加した。すなわち残基 386 がリジンだと (札幌耐性株) NA 安定性は低下することが示唆された。一方、セリンをグルタミンに置換しても $\Delta\Delta G$ に有意な差は認められず、両者の安定性は同程度 (セリンがやや安定) と予測された。

(2) トリ IFV A (H7N9) 中国株の HA 蛋白質のハイリスク変異の予測 (図 2)

平成 25 年 5 月、中国で鳥インフルエンザウイルス A(H7N9)のヒトへの感染が報告された。その時点で、A(H7N9)は大規模な流行には至らなかった。しかし、今後、変異を蓄積することで、ヒト-ヒト伝播効率の高い流行株が生じる可能性が危惧された。

2005 に東南アジアで流行した鳥インフルエンザウイルス A (H5N1)については、少なくとも HA の 2 種の変異がヒト-ヒト伝播能のリスク昂進に関わることが示唆されている。そこで、A(H7N9)中国株の HA 蛋白質についてこれら 2 種の変異と同等の効果をもたらす変異を包括的に予測し、

A (H7N9) の危機管理に資することとした。

①A (H7N9) 中国株 HA のヒト型受容体への親和性向上に寄与する変異：HA と基質（ヒト型受容体一部、またはトリ型受容体一部）の複合体モデルを構築し、受容体結合部位周辺の変異導入解析を実施し、ヒト型受容体への親和性向上に寄与する変異を網羅的に探索した。その結果、44 種類のリスク変異が見つかった。

②A (H7N9) 中国株 HA の安定性の向上に寄与する変異：A (H7N9) 中国株の HA 蛋白質分子モデルを構築し、HA 蛋白質三量体境界面周辺に変異を導入し、安定性の向上に寄与する変異を探索した。その結果、14 種類のリスク変異が見つかった。

D. 考察

(1) リスク評価

(i) IFV A (H1N1) pdm09 札幌耐性株：構造解析の結果、NA 蛋白質に生じた 386K 変異は構造を不安定にすることがわかった。NA 蛋白質の安定化が伝播能力昂進の主因であるならば、札幌耐性株の伝播能力が劇的に向上している可能性は低い。実際に、今の所、札幌耐性株は H1N1pdm 株の中でマイナーポピュレーションに留まっている。ただし、今後のリスク昂進の可能性はありえる。新たな変異と流行規模の拡大を注意深く監視することが重要と考えられる。

(ii) トリ IFV A (H7N9) 中国株：構造解析の結果、HA 蛋白質のヒト型受容体指向性と安定性を向上させる変異は数多くあることが判明した。この HA 蛋白質のリスクが新たな変異により高まる余地は十分に残されている。しかし、平成 26 年 1 月 30 日現在、予測した変異をもつ A (H7N9) 株は報告されていない。今回予測したリスク変異は、ヒトへの適応変異である。トリ体内の感染には不利であり、安定に維持されてヒトに伝達する確率は非常に低いことを示唆する。

平成 25 年 10 月にトリ IFV A (H7N9) 中国株の散発的な症例報告が中国であった。感染に関わったウイルスは、HA タンパク

質の可変性ループに変異を持っていた。しかし、この変異は HA 受容体結合部位周辺や多量体形成の境界面近傍には位置していないこと、我々の予測した HA 変異を持っていないこと、などから、新たな変異を獲得しない限り、ヒトでの流行のリスクは低いと判断した。その判断は、今の所正しく、この症例も含め、A (H7N9) 中国株のヒト-ヒトの大規模な拡散は報告されていない。

しかし、今後、1 月から 2 月にかけて中国の「春節」によりトリ-ヒトの接触が増し、人々の移動も増えると予想される。このような状況下では、リスク変異をもつ不安定なマイナーポピュレーションの A (H7N9) 変異株がヒトに感染する確率も高まる。今後も、リスク変異の発生を注意深く監視することが重要となる。

(2) 予測の迅速性

A (H1N1) pdm09 耐性株については、研究代表者に 2013. 12. 28 に解析を依頼され、2014. 1. 8 に「386K 変異は NA を不安定にする」旨の中間報告をした。構造安定性への影響は、数日内で判明した。A (H7N9) 株のリスク変異の予測については、複数の効果の網羅的な解析のため時間を要した。しかし約 1 ヶ月でリスク変異 58 種を同定した。

その後も解析を進め、結果の信頼性、再現性を検討したが、初期に得た結論に大きな修正は無かった。計算科学を用いれば実験では実現不可能な速度でリスク評価に資する構造情報が得られることが改めて確認された。

(3) 計算値の信頼性

2005 年にトリ IFV (H5N1) が東南アジアで流行した時、本法に類似の手法で HA のヒト型レセプター、トリ型レセプターへの指向性を計算し、実験結果 (Yamada, S. et. al. *Nature* 2006) と比較した。その結果、実験値が記載されている変異セットの全てにおいて、計算値は実験結果と一致した。したがって、本法で用いた計算法は、シアル酸指向性（受容体指向性）の解析においては十分な精度をも

つと考えている。

NA、HA 蛋白質の安定性の計算についても、十分な精度をもつと期待している。蛋白質工学の分野において、蛋白質改変を目的とした *in silico* 変異導入解析技術が開発されている。この技術は、確認できたサンプルでは実験値をよく反映することが報告されている。本研究では、この技術を変異蛋白質の安定性の評価に用いた。変異により安定化する／しないといった大まかな傾向の評価には十分な精度をもつと考えている。

本法に分子動力学解析を取り入れると、さらなる精度向上が見込まれる。しかし短所として解析に時間がかかる。例えば、A(H7N9)中国株の 58 種のリスク変異について分子動力学法を実施すれば、結果を得るのに 1 年以上を要する。本研究では、成果を速やかにサーベイランス組織に還元するために迅速性、包括性を重視した。従って、膨大な計算を要する解析は実施していない。解析手法については、今後も状況に応じて適宜、最適の方法を採用する方針である。

(4) リスク評価の注意点

現在の分子シミュレーション技術は、変異による構造特性の変化を物理化学の法則に則って比較的厳密かつ定量的に計算するレベルに達している。しかし、結果をリスク評価に還元する際には十分な注意が必要である。例えば、A(H1N1)pdm09 の解析において「386K 変異は NA 構造を不安定にする」ことはほぼ確実でも、それは直ちに「386K 変異にリスクは無い」との結論には至らない。本研究のリスク評価は、NA 蛋白質の安定化が伝播能力昂進の主因であるならば、との前提が正しい場合に成り立つ。したがって、386K 変異が、NA 構造の安定化以外のまだ知られていないメカニズムでヒト伝播能を昂進する可能性も想定すべきである。ただし、今回の場合は、その可能性は低い。現在の所、耐性株は、H1N1pdm の中ではマイナーポピュレーションに留まっている。この事実は、386K 変異には、伝播におい

て特段のアドバンテージを付与していないことを示唆する。

トリ A(H7N9)株のリスク変異の予測についてもまた、同様の注意を払う必要がある。この予測は、HA 蛋白質の受容体指向性の変化と安定化が伝播能力昂進の主因であるならば、との前提（過去のトリ A(H5N1)で得られた限定的な結果）が正しい場合に成立する。したがって、ウイルスが他のしくみでヒト伝播能を昂進することがあるのかどうかを知ることが重要になる。今の所、予測した変異をもつウイルスの報告はなく、並行してヒト-ヒトの大規模な拡散も報告されていない。今回予測した変異を持たないので流行できないと解釈できる。今後も監視を続けることにより、伝播能力昂進の主因は HA 蛋白質の受容体指向性の変化と安定化に絞って良いか否かが検証できると考えられる。

E. 結論

IFV A(H1N1)pdm09 札幌耐性株とニューカッスル株の NA 蛋白質のコンピュータを用いた変異導入解析を行い、札幌耐性株に特徴的な N386K 変異は NA の安定性を低下させること、したがって伝播能力が劇的に向上している可能性は低いことを示唆した。さらに鳥 IFV A(H7N9)中国株の HA 蛋白質について、ヒト-ヒト伝播能力を高める可能性のあるリスク変異を計 58 種予測した。平成 26 年 1 月下旬現在、予測した変異をもつウイルスの報告はなく、ヒト-ヒトの大規模な拡散も報告されていない。構造を基に得られるリスク情報は、疫学情報や生物学情報などとともにウイルスの迅速なリスク評価を総合的に行う上で有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the

monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother.* 2013;19:891-5.

2. 学会発表
3. なし

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

386K変異はNA蛋白質の安定化に寄与するか?

NAモデリング→*In silico*変異導入解析→構造安定性評価

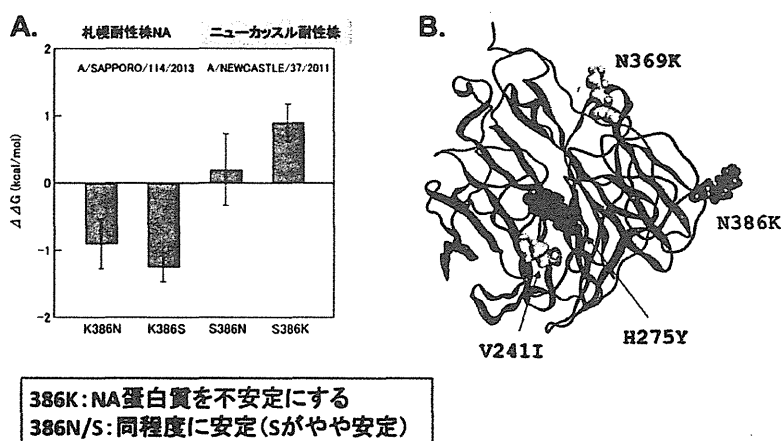


図 1. A(H1N1)pdm09 札幌耐性株の 386K 変異が構造安定性に与える影響。(A) 札幌耐性株、およびニューカッスル耐性株の NA 蛋白質の残基 386 について *in silico* 変異導入解析を行った。変異導入前後のエネルギー差 ($\Delta\Delta G$: kcal/mol) を指標として変異後の構造安定性を評価した。(B) A(H1N1)pdm09 札幌耐性株 NA 蛋白質の分子モデル。H275Y: 薬剤耐性変異。V241I, N369K: NA の安定性を増すと報告された変異 (Hurt AC., *J Infect Dis.* 2012; 206: 148-157)。N386K: 札幌薬剤耐性株に特徴的変異。

鳥インフルエンザウイルスA (H7N9)のリスク変異の予測

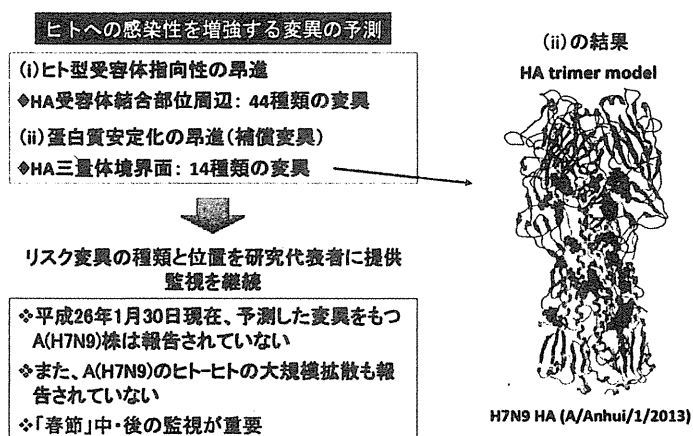


図2. 鳥インフルエンザウイルスA (H7N9)中国株のハイリスク変異候補の予測

A (H7N9) 中国株の HA 蛋白質と基質（ヒト型：SA α 2,6-Gal β 1-4GlcNAc、トリ型：SA α 2,3-Gal β 1-4GlcNAc）の複合体モデルを構築し、コンピュータを用いて変異導入解析を行い、HA 蛋白質のリスクを高める変異を計 58 種予測した。図には、HA 蛋白質の安定化に寄与する変異 14 種を示してある。これらは主に HA 三量体境界面に配置されている。

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、大下龍蔵（同上）

研究要旨

2012/2013 シーズン後半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、シーズン前半と比べて流行株の傾向に大きな変動は見られなかった。また、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も、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セグメント解析手法については、昨年度に作成した暫定プロトコルの改良を行い、*de novo* でのアSEMBル、解析費用の圧縮等に目処をつけた。引き続き情報処理の自動化に向けた検討を実施している。

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ルの整備を進めるとともに、高リスクが疑われる変異株が認められた場合には、全 8 セグメントの全長解析を実施し、病原性、増殖性等に係る遺伝子変異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SEMBル、の手順で行った。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。

高リスクが疑われる株や新型ウイルスが出現した際に必要となる全8セグメント解析のプロトコルについては、23年度までにA(H1N1)pdm09、A(H3N2)およびB型について順次整備を行ったのに引き続き、24年度からは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開始した。

(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	18	18
	A(H3N2)	53	53
	B	72	72
合計		969	952

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. 変異解析の概要

2013年7月から2013年8月までの間に、3回に分けて、2012/2013シーズン後半の分

離株を中心に計83株の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)。なお、前年度までは12月から翌1月にかけて、新シーズン初期の分離株の解析を行っていたが、研究代表者との協議により、今年度はこの分の解析は全量を感染研インフルエンザセンターで担当することとした。

2. A(H1N1)pdm09の変異解析

2012/2013シーズンは、2011/2012シーズンに引き続いて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分子系統解析を行ったところ、すでに報告しているHA1の系統樹と樹形がほぼ一致しており、クレード間での顕著な再集合は起こっていない判断された。NAセグメントの配列は、昨年度に解析した2012/2013シーズン初期までの分離株の傾向をほぼ引き継いでいた。すなわち、ワクチン株であるA/California/7/2009と比べると、V106IおよびN248Dの変異に加えて、オセルタミビル耐性変異(H275Y)の安定化に寄与すると報告されているV241IおよびN369Kの変異をすべて持っていた。ただし、今回解析した中に、H275Y変異を持つものはなかった。また、2013年末に札幌市で分離された複数のオセルタミビル耐性変異株すべてに共通して見られたN364K変異は、今回解析した株の中には認められなかった。

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

A (H1N1) pdm09 の場合と同様、NA セグメントのアミノ酸配列をもとに作成した系統樹は HA1 の系統樹と樹形がほぼ一致した。NA セグメントの配列は、2011/2012 シーズン以降、新たに L81P、N402D および D93G の変異を獲得したグループ (HA1 の系統樹ではサブクレード 3C に相当) へのシフトが見られたが、今年度に解析した株もほぼすべてがこのグループに属しており、新たな変異の蓄積も認められなかった。なお、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。

M1 には引き続き変異の蓄積は見られなかった。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% と減少し、2012/2013 シーズンは前半、後半とも検出されなかった。今年度に解析した株はすべて M2 に S31N のアマンタジン耐性変異を持っていた。

4. B 型の変異解析

2012/2013 シーズンは、2011/2012 シーズンに引き続き Victoria 系統と Yamagata 系統の混合流行が見られた。ビクトリア系統では、2011/2012 シーズン以降に N340D 変異を持つ株が顕著に増加したが、今年度に解析した株も 1 株を除いてすべてこのグループに属していた。一方 Yamagata 系統は、

2011/2012 シーズン以降に、HA1 の系統樹でクレード 2 に相当するグループが増加する傾向がみられたが、今年度の解析株もすべてこのグループに属していた。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。

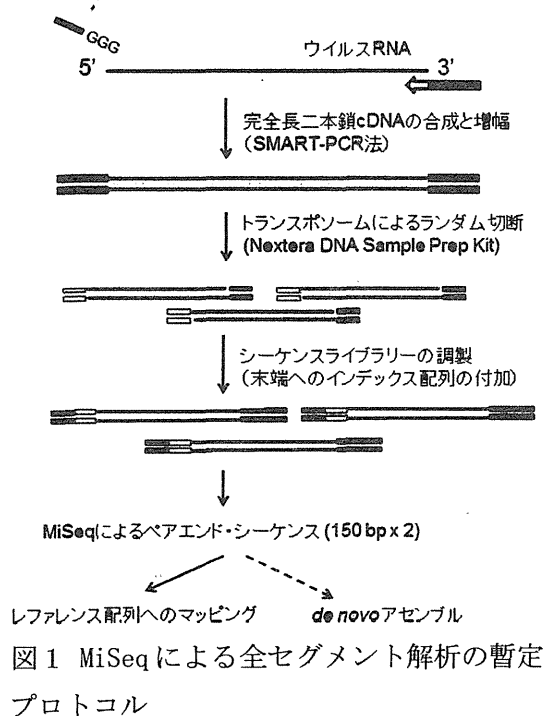
5. 次世代型シーケンサーを用いた全ゲノム解析プロトコルの整備

(a) プロトコル検討にあたっての考え方

サンガー法による全セグメント解析では、各型・亜型ごとに、また、各セグメントごとに、セグメントの末端配列および 10 個所程度の内部配列に対応するプライマーを設計する必要がある。そのため、流行株の変遷にともなって随時プロトコルの見直しが必要なほか、新型ウイルスが出現した際には新たにプロトコルを開発することが必要となる。一方、次世代型のシーケンサーは配列決定のスループットが格段に高いため、ランダムな位置からの配列を大量に取得してセグメント全長の配列を決定することが可能である。プロトコルの検討にあたっては、すべてのゲノムセグメントの 3' 末端側に高度に保存されている配列 (従来から逆転写用のユニバーサルプライマーとして利用されてきた配列 ; A 型では AGCAAAGCAGG の 12 塩基、B 型では AGCAGAAGCR の 10 塩基) のみに依存し、より多型の多い 5' 末端側の保存配列およびセグメント内部の配列には依存しない方法を採用することとした。これにより、未知のセグメントを含む新型のウイルスにもそのまま適用できる可能性が高いと考えられる。

次世代型のシーケンサーを用いたインフルエンザウイルスの全セグメント解析については、Roche 社の 454 シーケンサーや Illumina 社の GA シーケンサーを用いた例などがすでに報告されているが、次世代型

シーケンサーは配列決定のスループットが高い反面、1回の運転にかかる費用が高額なため、解析する株数が少ない場合には、1株あたりの解析費用が極めて高額となる。また、Illumina社のHiSeq等の大型のシーケンサーでは、1回の運転に一週間以上を要するため、機動性が要求されるサーベイランスの目的には適さないと判断した。そこで、解析費用および機動性の両面から判断して、Illumina社のベンチトップ型のシーケンサーであるMiSeqを使用し、一度に20株程度を同時に解析することを前提として、プロトコルの検討を行うこととした。



(b) SMART-PCR法による暫定プロトコル

上記の検討に基づき、昨年度に図1に示す暫定プロトコルを作成した。ここでは一本鎖RNAから二本鎖cDNAを合成するために、Clontech社のSMARTシステムを応用することとした。原プロトコルでは、mRNAのポリA鎖に相補的なオリゴT配列を含むプライマーを逆転写（1次鎖合成）に用いているが、このうちオリゴTの部分をインフルエンザウイルス用のユニバーサルプライマー（上記）の配列に置き換えたものを使用し

た。SMART-PCRでは、2次鎖合成に際してPCRによる増幅が行われるため、次ステップでシーケンスライブラリーを作成するために十分な量の二本鎖DNAを確保することができる。このプロトコルにより、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、Bのいずれの型についても、4日間で20株の配列データを取得することが可能であり、リファレンス配列へのマッピングによって8セグメントすべての全長配列をアセンブルできることを確認した。配列の冗長度はセグメント中央部で1,000以上、セグメント末端でも数十あり、ウイルス集団内での薬剤耐性変異等の割合を求める目的にも十分であった（図2）。しかし、(i) *de novo*でのアセンブルが難しくリファレンス配列へのマッピングが必要である、(ii) 1株あたりのランニングコストが5万円近いなど、いくつかの点で改良が必要と考えられた。

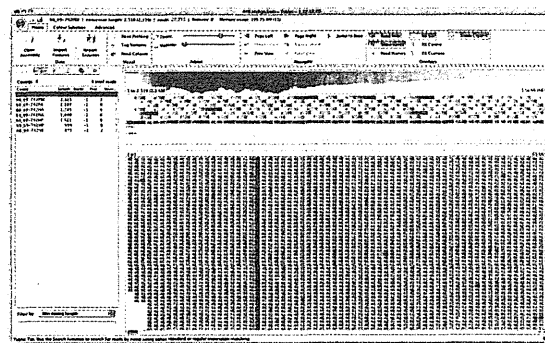
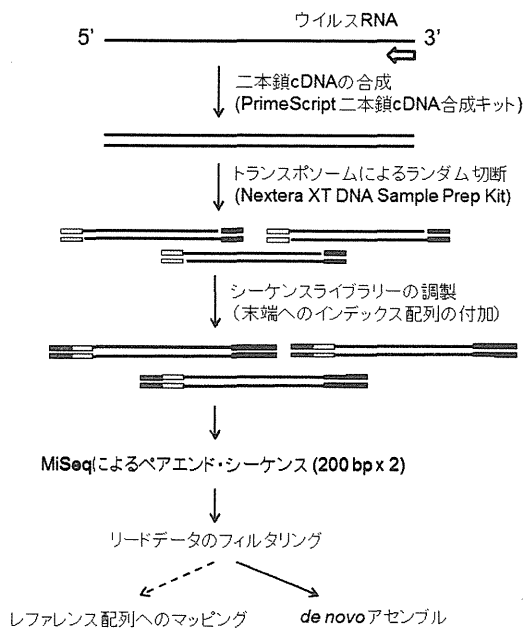


図2 アセンブル状況の例（PB2セグメント末端部分の拡大）

(c) プロトコルの改良

上記プロトコルで見いだされた問題点を踏まえ、本年度は以下の①から③の点について、改良を実施した（一部は実施途中）。現状での改良プロトコルを図3に示す。

図3 改良後の全セグメント解析プロトコル



①シーケンスリード長の最適化

MiSeqの最新バージョンであるv3では最大600サイクル（片鎖300塩基のペアエンド）のシーケンスが可能である。昨年度は片鎖150塩基のペアエンドシーケンスを行っていたが、運転時間および費用を考慮し、v2試薬で片鎖200塩基のペアエンドシーケンスを行うように改良した。Nextera XTキットで作成したライブラリーの平均長が約300塩基であるため、この条件では中央部で約100塩基のオーバーラップを生じることになり、アセンブルの際に有利となる。これにより、運転時間を約30時間に据え置いたまま、より精度の高いアセンブルが可能となった。

②二本鎖cDNA合成法の改良

解析単価を押し上げている最大の要因はSMART-PCRの試薬代であった。そこで二本鎖cDNAの合成ステップをより一般的な方法に置き換えることを試みた。幸い、Illumina社のライブラリー調製キットであるNextera DNA sample prep kitがNextera XTにバージョンアップされたことにより、ライブラリー作成に必要なDNA量が従来の50 ngから1 ngに減少したため、二本鎖合成のステップでPCRを行う必要性が薄れた。そこで、2次鎖の合成に特異プライマーを必要としないニック・トランスレーション

法を採用した方法として、タカラバイオのPrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kitを用いたところ、良好な結果が得られた。これによりcDNA合成にかかる費用を約1/5に圧縮することができた。他の要因と合わせて、1株あたりのランニングコストは2万円弱となり、従来サンガー法で全セグメント解析を行う場合（約1万5千円）と同程度にまでランニングコストを圧縮することができた。ただし、cDNA合成の段階でPCRを行わないため、初期RNA量の影響をより強く受けることとなった。この点については更に検討が必要と思われる。なお、SMART-PCRを用いる場合と比較して、セグメント末端部での配列冗長度の低下がより顕著であったが、アセンブルに使用するリード長を増やすことで対応は可能であった。

③宿主由来配列の除去

*de novo*でのアセンブルを阻害している要因を分析したところ、ウイルスの培養に用いた宿主細胞（MDCK）に由来するリードが全リードの40-90%（SMART PCRを用いた場合でも10-20%）に達しており、これがアセンブルミスを引き起こしていることがわかった。そこで宿主由来配列を除去するため、コンピュータによるフィルタリングおよびRNAの精製処理の両面から検討を行っている。

コンピュータによって宿主由来の配列をフィルタリングするため、①イヌ、ニワトリのゲノム配列等からなるデータベースを作成し、これにヒットするリードを除外する方法、および②NCBIから取得したインフルエンザウイルスの配列（約7万株分）からなるデータベースを構築し、これにヒットするリードのみを残す方法、の2つを比較検討し、両者でほぼ同等のフィルタリング効果が得られることを確認した。これにより、前述のリード長の最適化と合わせて、リファレンス配列に依存しない*de novo*

でのアセンブルが可能となった。後者のほうがデータベースサイズが小さいためより高速にフィルタリングを行なうことができる。計算能力に限られるデスクトップPCやMacを使用する場合でも、後者の方法であれば実用的なスピードでフィルタリングを実行可能と思われる。

一方、RNAの精製処理については、扱うRNA量が微量であるため、エタノール沈殿等が必要となるDNase処理は不向きと考えられた。そこで、一本鎖RNAのみを吸着するカラムを用いた方法を検討中である。

(d) データ処理パイプラインの構築

次世代型シーケンサーを用いる場合、データ量が膨大となるため、データ処理の自動化が必須と考えられる。そこで、ホスト由来配列等の除去、アセンブル、コード配列の抽出とアミノ酸配列への翻訳、変異個所の抽出、変異割合の算出等の一連の処理を自動化するためのパイプラインを構築中である。処理プログラムはシステムに依存しないJAVA言語を使用しているため、LinuxもしくはMacOSのいずれでも実装可能なものとなる予定である。

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、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、従来法に比べて格段に高いため、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。ただし、複数の株が混合感染しているような場合にどの程度対応できるかは、今後さらに検討が必要である。

E. 結論

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、2012/2013 シーズン初期までの流行を引き継いでおり、新たなクレードに遷移する傾向は見られなかった。また、薬剤耐性変異を含めて、懸念される変異の蓄積は認められなかった。次世代型シーケンサーを用いた全8セグメント解析のプロトコルについて検討を行い、実用的な期間（4日程度）および費用（1株あたり約2万円）で20株程度を同時に解析する目処がたった。

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, 土井輝子, 伊東玲子, 佐藤 彩, 菅原裕美, 江島美穂, 金 南希, 三浦 舞, 今井正樹, 小田切孝人, 田代真人, 小口晃央, 大下龍蔵, 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. 2012/13 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, 34, 328-334, 2013.

〔その他〕

- 1 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.
- 2 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**, 408-414, 2013.
- 3 Miura, H., Hori, K., Sasaki, Y., Inahashi, Y., Yagisawa, Y., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.: Simple analytic method of diaminopimelate epimerase activity. *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 253-255, 2013.
 - 4 Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Shizuri, Y., Ichikawa, N., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.: *Illumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Illumatobacter coccineum* sp. nov. isolated from seashore sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 3404-3408, 2013.
 - 5 Shintani, M., Hosoyama, A., Ohji, S., Tsuchikane, K., Takarada, H., Yamazoe, A., Fujita, N. and Nojiri, H.: Complete genome sequence of the carbazole degrader *Pseudomonas resinovorans* CA10 (= NBRC 106553). *Genome Announc.*, **1**, e00488-13, 2013.
 - 6 Matyi, S., Hoyt, P., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Fujita, N. and Gustafson, J.: Draft genome sequences of *Elizabethkingia meningoseptica*. *Genome Announc.*, **1**, e00444-13, 2013.
 - 7 Fujinami, S., Takarada, H., Kasai, H., Sekine, M., Omata, S., Harada, T., Fukai, R., Hosoyama, A., Horikawa, H., Kato, Y., Nakazawa, H. and Fujita, N.: Complete genome sequence of *Illumatobacter coccineum* YM16-304^T. *Stand. Genomic Sci.*, **8**, 430-440, 2013.
 - 8 Ohtsubo, Y., Fujita, N., Nagata, Y., Tsuda, M., Iwasaki, T., and Hatta, T.: Complete genome sequence of *Ralstonia pickettii* DTP0602, a 2,4,6-trichlorophenol derader. *Genome Announc.*, **1**, e00903-13, 2013.
 - 9 Mochizuki, D., Arai, T., Asano, M., Sasakura, N., Watanabe, T., Shiwa, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Fujinami, S., Fujita, N., Abe, A., Sato, J., Nakagawa, J. and Niimura, Y.: Adaptive response of *Amphibacillus xylanus* to normal aerobic and forced oxidative stress conditions. *Microbiology*, 2014, in press (DOI: 10.1099/mic.0.068726-0)
 - 10 Ohji, S., Hosoyama, A., Tsuchikane, K., Ezaki, T., Yamazoe, A. and Fujita, N.: The complete genome sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164^T confirms high intraspecies variation. *Genome Announc.*, **2**, e00029-14, 2014.
 - 11 Yamamura, H., Ashizawa, H., Hamada, M., Hosoyama, A., Komaki, H., Otaguro, M., Tamura, T., Hayashi, Y., Nakagawa, Y., Ohtsuki, T., Fujita, N., Ui, S. and Hayakawa, M.: *Streptomyces hokutonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the strawberry root rhizosphere. *J. Antibiot.*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究」

「2013-14年シーズンのインフルエンザワクチンの血清学的評価」

研究分担者 齋藤 玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者 日比野亮信、菖蒲川由郷、近藤大貴（新潟大学大学院医歯学総合研究科）、
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

2013-2014 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/H1N1pdm09 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 100 名（平均年齢 42.0 才）と、高齢入所者 46 名（平均年齢 87.4 才）のワクチン接種前後の抗体価を HI 法で測定し、成人と高齢者における変化を評価した。結果として、成人では A/H1N1pdm09, A/H3N2, B で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。高齢者では接種後に A/H1N1pdm09 と A/H3N2 は 70%以上の良好な抗体価保有率（HI 抗体 40 倍以上）をみとめたが、B 型に関しては 52%の保有率で十分な抗体価が得られない傾向があった。接種後の副反応については、医療従事者、高齢者共に半数近くが局所の発赤を訴えたが、重篤な全身反応は見られなかった。

さらに、前シーズン（2012-2013）において本人が罹患したと申告した医療従事者の 6 名は、A/H3N2 の接種前の HI 抗体価の平均値が 142.5 と高く H3N2 に罹患したと推測された。接種後の HI 抗体価は 226.3 と 1.2 倍の上昇が有りブースター効果が見られた。

2014 年 2 月 5 日現在、当教室では全国 5 府県（北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県）の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を 94 件採集し、A/H1N1pdm09 が 18 件（62.1%）、A/H3N2 が 5 件（17.2%）、B 型ビクトリア系統が 2 件（6.9%）、B 型山形系統が 4 件（13.8%）と、A/H1N1pdm09 が過半数を占めた。なお、A/H1N1pdm09 は全て感受性株で H275Y 変異は認められなかった。

A. 研究目的

本調査では、高齢者施設の医療従事者（成人層）と入所者（高齢者層）を対象に、2013-14年シーズンの日本の三価インフルエンザワクチン、A/カリフォルニア/7/2009（H1N1）pdm09、A/テキサス/50/2012（H3N2）、B/マサチューセッツ/02/2012（山形系）に対する、ワクチン接種前後の抗体価の変化を赤血球凝集素阻害試験（HI 法）で評価した。また、聞

き取り調査により前シーズンにインフルエンザに罹患したと考えられる成人について HI 抗体価のサブ解析を行った。

B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設の医療従事者と入所者に対し、研究についての十分なインフォームドコンセントを取った上で、年齢、前シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。

調査の参加者には、2013年10-11月にデンカ生研社製の2013-14年シーズンHAインフルエンザワクチン（三価）を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種3-4週間後の2回、血清を採血した。接種後48時間以内の副反応について自己申告で報告してもらった。

血清は採取後すぐに血清分離し、抗体価検査を行うまで-20℃にて新潟大学で保管した。ワクチン接種前後の抗体価は、赤血球凝集抑制試験（HI）法にて定法にのっとり、モルモット赤血球と、デンカ生研社製のA/H1N1pdm抗原（A/カリフォルニア/7/2009）、H3N2抗原（A/テキサス/50/2012）、B抗原（B/マサチューセッツ/02/2012）を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設の医療従事者を“成人群”とし、高齢者施設の入所者を“高齢者群”として、大きく2群に分けて評価した。さらに、成人群では前年度のインフルエンザ罹患の情報により、前シーズン（2012-2013）にインフルエンザに罹患した群（罹患群）、と罹患しなかった群に分けて抗体価のサブ解析を行った。抗体価の評価にはワクチン接種前後の幾何平均抗体価（GMT）と40倍以上の抗体保有率（HI抗体価保有率）を用いた。接種後の抗体価の上昇幅の評価は、接種後の抗体上昇比（mean fold increase）と、抗体価応答率（ワクチン接種後に4倍以上の抗体価上昇があった人の割合）を用いた。

（倫理面への配慮）

患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

C. 研究結果

高齢者施設において、成人群のペア血清は100件、高齢者群のペア血清は46件採取された。成人群の平均年齢は42.0±12.3歳、高齢者群の平均年齢は87.4±7.0

歳であった（表1）。

ワクチン接種前後の平均HI抗体価（GMT）については、成人群でA/California/7/2009接種前57.4、接種後91.9、A/Texas/50/2012接種前54.3、接種後96.5、B/Massachusetts/2/2012接種前49.9、接種後69.2であった。一方で、Mean fold increaseは、A/California/7/2009 2.1、A/Texas/50/2012 2.2、B/Massachusetts/2/2012 1.5と反応は国際基準（成人層 mean fold increase >2.5）に比べるとやや低めであったが、接種前値が高いため頭打ち現象がみられたと考えられる。

高齢者ではA/California/7/2009接種前45.1、接種後81.2、A/Texas/50/2012接種前33.4、接種後73.1、B/Massachusetts/2/2012接種前17.2、接種後33.9であった。Mean fold increaseは、A/California/7/2009 2.4、A/Texas/50/2012 3.2、B/Massachusetts/2/2012 2.9と、国際基準（高齢者 mean fold increase >2.0）を満たす良好な反応であった。

40倍以上の抗体価保有率は、成人群でA/California/7/2009接種前71.0%、接種後93.0%、A/Texas/50/2012接種前70.0%、接種後93.0%、Massachusetts/2/2012接種前74.0%、接種後86.0%であり、3種の抗原とも前値から高く、結果的に接種後の抗体価保有率もすべてで国際基準の70%を超す良好な結果であった。一方、高齢者ではA/California/7/2009接種前58.7%、接種後78.3%、A/Texas/50/2012接種前52.2%、接種後84.8%、B/Massachusetts/2/2012接種前26.1%、接種後52.2%であり、A/H1N1psm09とA/H3N2は前値も高く接種後抗体価も国際基準の60%を超していた。しかしながらB型はHIの前値の有効抗体保有率が2割強と低く、結果的に抗体価は上昇したものの60%にはわずかに及ばなかった。例年みられるように成人層の抗体価の保有

率は、高齢者層に比して高く、接種後の抗体価保有率も高かった。

接種後の反応を、抗体価応答率（抗体価 4 倍以上の上昇率）で評価すると、成人層では、A/California/7/2009 で 9.0%、A/Texas/50/2012 で 18.0%、B/Massachusetts/2/2012 で 6.0%であった。高齢者群では A/California/7/2009 で 21.7%、A/Texas/50/2012 で 30.4%、B/Massachusetts/2/2012 で 28.3%と数値上、高齢者群のほうが反応は良い傾向にあったが、成人層では接種前値が高いため、頭打ち効果が影響して逆に上昇率が悪くなっていると考えられた。

次に、成人層を前シーズン（2012-2013）にインフルエンザに罹患した 6 名（罹患群）と罹患しなかった 100 名にわけて HI 抗体価を解析した（図 1）。罹患したと申告した群は、HI 抗体価の平均値は A/California/7/2009 接種前 44.9、接種後 89.8、A/Texas/50/2012 接種前 142.5、接種後 226.3、B/Massachusetts/2/2012 接種前 40.0、接種後 44.9 であった。40 倍以上の抗体価保有率は、罹患群で A/California/7/2009 接種前 66.7%、接種後 100.0%、A/Texas/50/2012 接種前 100.0%、接種後 100.0%、B/Massachusetts/2/2012 接種前 50.0%、接種後 66.7%であり、A/H3N2 の接種前の HI 抗体価が高かったことから昨シーズンに罹患したと申告した成人は、A/H3N2 に罹患したものと判断された。非罹患群の HI 抗体価は成人の全体的な値と変わりがなかった。

ワクチン接種後の副反応について、成人 100 名と高齢者で比較したところ、最も多い副反応が成人層、高齢者共に局所の発赤で、それぞれ 48.0%、47.8%であった（表 2）。次に多いのが局所の腫れで、成人で 41.0%、高齢者で 6.5%であった。その他、全身的な重度の副反応は認められなかった。

[追加情報]

2013-14 年シーズンの新潟大学国際保

健学分野におけるインフルエンザ検出状況

2014 年 2 月 5 日現在、当教室では全国 5 府県（北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県）の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を 94 件採集した。臨床検体そのものまたは MDCK 培養株から、RNA を抽出し、cDNA を合成し、サイクリングプローブ法にて（リアルタイム PCR）、A/H1N1pdm09、A/H3N2、B 型山形系統、B 型ビクトリア系統を判別した。A/H1N1pdm09 については、同じくサイクリングプローブ法で NA 遺伝子にオセルタミビル・ペラミビル耐性となる H275Y 変異をもつかどうか判定した。

結果は、A/H1N1pdm09 が 18 件（62.1%）、A/H3N2 が 5 件（17.2%）、B 型ビクトリア系統が 2 件（6.9%）、B 型山形系統が 4 件（13.8%）と、A/H1N1pdm09 が過半数を占めた（表 3）。なお、A/H1N1pdm09 は全て感受性株で H275Y 変異は認められなかった。各型・亜型の地理的な分布には差があるがまだまだシーズンのはじめで有り、H275Y 変異株の出現も含めて今後の動向を監視する必要がある。

D. 考察

高齢者施設の医療従事者（成人層）100 名と高齢者施設の入所者 46 名（高齢者群）について、2013-2014 年シーズンのインフルエンザワクチン接種前後の A/H1N1pdm09、A/H3N2、B に対する HI 抗体価をそれぞれ測定し評価した。

成人層では A/H1N1pdm09、A/H3N2、B いずれに対しても 40 倍以上 HI 抗体価保有率は接種後に 80-90%を超える高さであり、ワクチンの免疫原性は十分であると言える。しかし、ワクチン接種前の抗体価がすでに高いことも寄与していると考えられる。当該施設ではほとんどのスタッフが毎年ワクチン接種をしており、さらに前年度と比べ 3 種類のインフルエンザワクチンの抗原性に大きく変化がなかったこともあり、接種前の抗体価がすでに獲得されていたと考えられる。高齢者では、

A/H1N1pdm09、A/H3N2、では接種後の HI 抗体価保有率が 70-80%と良好であったが、B 型が接種前 26.1%と低く、接種後も 52.2%とやや低めであった。前年度は、3 種類の抗原とも、成人層、高齢者層ともに接種後に 70-90%の抗体価保有率を持っていたが、今年度はやや高齢者が B 型で低い傾向にあった。しかし、全体的にみるとワクチンの免疫原性は国際基準をみたしており、良好であったと判断できる。

前年度にインフルエンザに罹患したと申告した成人層（スタッフ）は A/H3N2 での接種前抗体価が高く、接種後もブースターが見られ、A/H3N2 に罹患したと考えられた。スタッフの所属は施設内のそれぞれ異なる階（2 階と 3 階）であり、施設の入所者（高齢者）にはインフルエンザ罹患は見られなかったため、院内感染対策が有効になされて流行蔓延が防がれたと考えられた。院内感染は、多くの場合、スタッフの持ち込みによる場合が多いため、今後ともワクチン接種率を高く保ち、患者が出た場合にはスタッフの場合は早めの治療と欠勤措置による隔離、高齢者の場合は、部屋の隔離や医療スタッフの標準感染予防策の施行が有効であると考えられる。

ワクチンの有効性の評価には 1) 免疫原性評価、2) 発症予防（ワクチン効果）、3) 安全性（副反応評価）がある。今回の調査では 1) と 3) を評価した。免疫原性について十分な反応が得られ、さらに安全性に（副反応）についても、局所の反応のみで全身的な重篤な症状はみられなかったため、インフルエンザワクチンの安全性が示された。2) の発症予防については、インフルエンザ罹患の有無を用いてワクチン効果を算出する必要があるが、当該施設ではほとんどのスタッフも高齢者もワクチン接種を行っているため、非接種群が得られずワクチン効果の評価はできなかった。しかし、過去の我々の調査から高齢者施設のワクチン接種率が下がるとインフルエンザ流行が見られるため、今後もスタッフ、入所者共にワ

クチン接種率は高く保たねばならない。

全国的な 2013-2014 年シーズンの流行状況は、当教室の調査では A/H1N1pdm09 が優勢な状況である。国立感染症研究所の病原体検出情報でも今シーズンは同様に全国的に A/H1N1pdm09 が優勢ある。また、今シーズンは札幌市でオセルタミビル・ペラミビル耐性となる H275Y 変異株の検出が報告され、全国的な耐性株の蔓延が懸念されている。当教室の調査では A/H1N1pdm09 は感受性で有り、H275Y 変異株は検出されていない。同研究所によると、これら札幌で地域的に発生した H275Y 変異株は樹形図解析から中国由来であることが示唆されている。しかし、国立感染症研究所と地方衛生研究所の報告によると、2013 年末から、大阪、三重、山形などで札幌との疫学リンクのない H275Y 変異株が見つかり、今後も変異株の蔓延が心配されている。

E. 結論

2013-2014 年シーズンワクチンの免疫原性の評価を行い、成人、高齢者共におおむね良好な結果が得られた。インフルエンザワクチン株は毎年流行する株に応じて国立感染症研究所がワクチン株を変更している。このため、毎年接種後に血清採血を行ってワクチンの免疫原性の調査を行う必要がある。今後も継続的な調査が必要である。

副反応も局所反応のみで重篤な症状はみられずワクチン接種の安全性が示された。

抗インフルエンザ剤の有効性を減じてしまう耐性株の蔓延は臨床的に大きな問題である。これまでのところ、今シーズンは H275Y 変異株の大流行はないものの、過去には季節性 A/H1N1 で 100%が変異株に置き換わる現象が見られたため今後も注意深くサーベイランスを続ける必要がある。

謝辞：調査にご協力いただいた女池南風苑

スタッフの方々に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 日比野亮信、近藤大貴、Clyde Dapat
Isolde Dapat、佐藤康平、八神錬、菖蒲
川由郷、齋藤玲子、黒木麗喜、真崎宏則.
2012/13 シーズン夏季に長崎で採取され
たA/H3N2 インフルエンザウイルスのシー
クエンス解析結果の報告. 病原体検出情
報 (IASR) Vol. 34 11月号 p. 339-342、
2013年

2. 学会発表

なし

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

なし