

### 3. RNA 抽出キットについて

表8 各所でのRNA抽出

RNA抽出キット名	地衛研数	1回の抽出に使用する検体量	1回の抽出での溶出量
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	65	140 $\mu$ L 64地衛研	60 $\mu$ L前後 65地衛研
		138 $\mu$ L 1地衛研	
High Pure Viral RNA Kit (Roche)	6	200 $\mu$ L 6地衛研	50 $\mu$ L 6地衛研
RNeasy Mini Kit (QIAGEN)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	100 $\mu$ L 1地衛研
MagDEA viral DNA/RNA 200 (Precision System Science)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	50 $\mu$ L 1地衛研

<コメント>

RNA 抽出キットについては、QIAamp Viral RNA Mini Kitを使用している地衛研が大多数でしたが、それ以外のキット(自動抽出装置を含む)を使用している地衛研もいくつかありました。抽出効率はキットにより異なることがあります。ウイルス RNA が高濃度の場合は RNA 抽出効率に問題がなくても、ウイルス RNA が低濃度の場合に、RNA 抽出効率が極端に悪くなるものもあります。反応試薬と同様、RNA 抽出キットについても感染研マニュアルに記載のキット以外を使用する場合は、そのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査に使用するかどうか、事前に検討していただく事をお勧めします。

(添付資料13)

<報告していただいた総合判定結果>

検体名	A	B	C	D	E	F
総合判定結果	A/H1pdm	A/H7	A/H3	A/H5	陰性(検出限界以下)	A/H5
その他の場合						
備考	conv PCR法での結果、A/H1 pdm	conv PCR法での結果、A/H7	conv PCR法での結果、A/H3	conv PCR法での結果、A/H5	conv PCR法での結果、陰性	conv PCR法での結果、A/H5

<報告していただいたパネル検体の結果>

\* 各検体の濃度は、500 μLの水で溶解後のおおよその濃度

パネル	RNA抽出必要なパネル					抽出不要パネル
	検体A	検体B	検体C	検体D	検体F	
パネルの亜型	H1N1pdm09	H7N7	H3N2	H5N2	H5N1	
copies/μL*	80	80	8	200	80	
データ1	Type A 亜型	31.1 32.2	32.1 32.7	35.5 38.0	30.5 31.9	32.5 32.7
データ2	Type A 亜型	0.0 0.0	0.0 32.4	0.0 35.0	0.0 30.9	0.0 31.8

<トラブルシューティングについて>

- 現時点で大きな問題は見受けられませんでしたので、トラブルシューティングの必要はありません。
- 現時点で見られた問題について、別添資料に従ってトラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。
- 現時点で見られた問題について、下記の方法に従って、トラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。  
方法:( )
- 現時点で問題は見られるものの、すぐにトラブルシューティングを行う必要はなさそうです。今後、検査結果を注視してください。

<総合判定結果へのコメント>

全てのパネル検体について、正しく判定できていました。

<パネル検体の結果へのコメント>

・1回目の検査で、検体CのH3のCt値が陽性コントロールよりも高く出ているため、再検査を実施されていますが、増幅曲線がきれいに確認できていた場合は、陽性として問題ありません。もし、再検査を実施する場合には、この検体は検出限界付近の濃度であると考えられるため、反応液中の検体濃度を上げて実施することをおすすめします。

・1回目の検査でH5およびH7検出系でスタンダードカーブを引けなかったため再検査を実施していますが、これらの検査に使用している陽性コントロールは検出限界付近の濃度の点も含むため、必ずしも全ての点が直線に乗るとは限りません。陽性コントロールで検出するべき希釈液で陽性となっていれば、検査の検出感度は担保できていると考えられます。今回、直線に乗らなかった理由としては、陽性コントロールの劣化や希釈液作製時の手技に起因する部分がある可能性もありますので、トラブルシューティングの必要性についてご検討ください。

## 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

研究分担者 今井 正樹 東京大学医科学研究所・准教授

研究協力者 渡邊 真治 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1室長

岸田 典子 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  
主任研究官

### 研究要旨

患者検体からウイルス分離/検出を行う地方衛生研究所（地衛研）職員の経験不足や技術力低下が指摘されるなど、日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス機能の低下が懸念されている。本研究では、日本の株サーベイランス体制の強化と改善を資することを目的に、地衛研におけるウイルス分離培養検査体制についての現状調査を実施した。さらに、検査体制に問題のある地衛研に対して検査技術の支援を行った。平成 25 年度は全国の地衛研を対象にウイルス分離検査体制に関するアンケート調査を実施し、検査体制に問題のある地衛研を特定した。平成 26 年度は分離効率の低かった地衛研を対象にヒアリング調査を実施した。また、検査法の改善策について各地衛研と個別に協議した。平成 27 年度は分離検査体制についての 2 回目のアンケート調査を実施し、ウイルス分離効率の改善がみられない地衛研を特定した。また、研修の要望があった地衛研を対象に実地研修を行った。

### A. 研究目的

患者から分離されたウイルスは、ウイルスの性状解明には欠かすことのできないものである。さらに、国内に侵入した新型ウイルスのヒトに対するリスク評価を行う際にも分離ウイルスは無くしてはならないものである。

全国約 5,000 カ所のインフルエンザ定点医療機関でインフルエンザ様疾患の患者から採取された臨床材料は、各地方の衛生研究所に送付され、ウイルスの分離培養と同等が行なわれている。全国の地方衛生研究

所（地衛研）によって毎年 5 千株近くのウイルスが分離され、迅速に解析されている現在の株サーベイランス体制は、世界的に見ても非常に高いレベルにある。しかしその一方で、インフルエンザ対策に充てられる予算と人員の削減が各自治体で進められており、地衛研における株サーベイランス業務の的確な遂行が困難になりつつある。

本研究では、日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス体制の強化と改善を目的に、地衛研におけるウイルス分離培養検査体制についての現状調査を実施した。

さらに、検査体制に問題のある地衛研に対しては、検査技術の支援を行った。

## B. 研究方法

- 1) 日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス体制の現状と問題点を把握するために、全国の地衛研を対象にインフルエンザウイルスの分離検査技術に関するアンケート調査を実施した。
- 2) アンケート調査に基づいて検査体制に不備があると考えられる地衛研を対象に電話によるヒアリング調査を実施した。
- 3) 検査体制に問題のある地衛研を対象に実地研修を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果および考察

- 1) ウイルス分離検査体制に関するアンケート調査

地衛研のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するために、全国の 73 カ所の地衛研を対象にアンケート調査を実施し、72 カ所の地衛研から回答が得られた。過去 3 シーズン (2010/11、2011/12、2012/13) におけるインフルエンザウイルスの分離効率をたずねたところ、3 シーズン連続して分離効率の低い研究機関が 1 割程度あったが、ほぼ半数の研究機関は、高い効率で分離していた。多くの研究機関はウイルス分離に用いる培養細胞を概ね適正に維持管理していることもわかった。

一方、人事異動によって担当職員が頻繁に入れ替わることから、地衛研でのウイルス検査技術に関する知識や技術の継承が非常に困難であるとの意見が多数寄せられた。

- 2) ウイルス分離検査体制に対する聞き取り調

査

過去 3 シーズン (2010/11、2011/12、2012/13) において分離効率の低かった地衛研を対象にヒアリング調査を実施した。その結果、調査対象となった地衛研の約半数は、ウイルス量の少ない臨床材料を検査対象に多く含んでいたために、3 シーズンにおける分離効率が低かったことが判明した。これらの機関は、ウイルス量が比較的多い臨床材料では高い効率で分離していたことから、分離培養検査を適切に実施していると判断した。一方、調査対象となった地衛研の多くは培養細胞を適切に管理維持できていないことがわかった。

ウイルス分離検査担当者が交代する際の引き継ぎに必要な期間を全く設けることができない地衛研が存在することが、この調査からも判明した。

- 3) ウイルス分離検査体制に対する 2 回目のアンケート調査

全国の地衛研を対象にウイルス分離検査体制についての 2 回目のアンケート調査を実施し、77 カ所の地衛研から回答が得られた。2014/15 シーズンにおける分離効率について質問したところ、回答した研究機関の約半数は 75%以上の高い効率で分離していることがわかった。しかし、25%未満の低い効率でウイルスを分離していた機関が 1 割程度あり、このうちの約半数は前回の調査から分離効率が改善していなかった。

- 4) ウイルス分離検査の実地研修

研修の要望があった 2 ケ所の地衛研を対象に実地研修を行った。2 機関とも前任者からの引継ぎがうまく行っていなかったこと、また経験者がいなかったことから、両機関における担当者は、ウイルス分離技術に関する基本的な内容について十分に理解

していなかった。研修では、それぞれの機関における現行法の問題点を確認し、改善策を助言した。

#### D. 考察

ウイルス分離検査担当者が交代する際、引き継ぎが一切行われていない、あるいは不十分な形でしかなされていない地衛研があることがアンケート調査及びヒアリング調査から判明した。このような地衛研ではウイルス分離検査に必要な知識・技能を持たない職員が検査を実施したために、ウイルス分離効率が低くなったと考えられる。新型ウイルスは、いつ何時どこから国内に侵入するか予想することはできない。その侵入を早期に捉え、リスクを適正に評価するためには、全国地衛研が一律の精度でウイルスを分離できる体制を構築しておくことが必要である。そのためには、ウイルス分離検査業務に関して一定レベル以上の知識と技術を持った人材がすべての地衛研に必要である。本調査から、自力による人材育成が困難な地衛研が少なからず存在することが明らかになった。今後は、このような地衛研を重点的に支援することで、日本における株サーベイランス体制の維持を図っていく必要がある。

加えて、検査結果の信頼性を保証するための精度管理体制を各地衛研に構築することも必要である。これを実行することで、全ての地衛研がウイルス分離検査を一定水準以上の精度で行える基盤が国内に整備され、日本の株サーベイランス体制の機能強化が図れると考えられる。

#### E. 結論

地衛研のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状を調査し、検査体制に問題のある地衛研を特定した。問題のある地衛研

に対して、研修などの技術支援を実施した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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, R.P., 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, A.J., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E.A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J.C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y.: Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501:551-555, 2013.

Yang, T., Kataoka, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Kishida, N., Shirakura, M., Imai M., Asanuma, H., Takeda, N., Wakita, T., Li, T.: Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 94:2647- 2656, 2013.

Kishida, N., Imai, M., Xu, H., Taya, K., Fujisaki, S., Takashita, E., Tashiro, M., Odagiri, T.: Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.*

- Wilker, P. R., Dinis, J. M., Starrett, G., Imai, M., Hatta, M., Nelson, C. W., O' Connor, D.H., Hughes, A.L., Neumann, G., Kawaoka, Y., Friedrich, T.C.: Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat. Commun.* 4:2636, 2013
- Imai, M., Herfst, S., Sorrell, E.M., Schrauwen, E.J., Linster, M., De Graaf, M., Fouchier, R.A., Kawaoka, Y.: Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Res.* 178:15–20, 2013
- Fan S, Hatta M, Kim JH, Halfmann P, Imai M, Macken CA, Le MQ, Nguyen T, Neumann G & Kawaoka Y. Novel residues in avian influenza virus PB2 protein affect virulence in mammalian hosts. *Nat. Commun.* 5:502, 2014
- Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ & Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 15:692–705, 2014
- Herfst S, Imai M, Kawaoka Y & Fouchier RA. Avian influenza virus transmission to mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385:137–155, 2014
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. *Jpn J Infect Dis* in press, 2015.
- Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Molecular determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus. *J Virol* 89:11337–11346, 2015
- Shoemaker JE, Fukuyama S, Einfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation. *PLoS Pathog* 11:e1004856, 2015.
- Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun* 6:6600, 2015.
- Ping J, Lopes T.J.S, Nidom CA, Ghedin E, Macken CA, Fitch A, Imai M, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Development of high-yield influenza A virus vaccine

viruses. Nat Commun 6:8148, 2015.

Hanson A, Imai M, Hatta M, McBride R, Imai H, Taft A, Zhong G, Watanabe T, Suzuki Y, Neumann G, Paulson JC, Kawaoka Y. Identification of Stabilizing Mutations in an H5 HA Influenza Virus Protein. J Virol (in press), 2015.

## 2. 学会発表

今井正樹 中国で発生した鳥インフルエンザ A (H7N9) について 第 47 回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、北海道奈井江町、7 月 (2013)

小林知也、今井正樹、内藤郁慶、松山州徳、村上賢二 北東北地方のコウモリから検出されたベータコロナウイルス遺伝子の解析 第 157 回日本獣医学会、札幌市、9 月 (2014)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 遺伝子情報計算科学を基にハイリスク変異株の予測・評価法の開発

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）、伊藤公人（北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門・教授）

### 研究要旨

計算科学の諸技術を株サーベイランス体制強化に活用した。①研究代表者と共同で、インフルエンザの疫学・ウイルス学・計算科学の研究を統合的に実施する連携体制と環境を整えた。②この基盤を用いて、高度危険性が疑われた薬剤耐性株（H1N1pdm09札幌株）の感染の終息を予測した。また中国で発生したヒト感染能をもつトリA（H7N9）株の流行リスクを高めるHAリスク変異を予測した。③予測を代表者に提供してハイリスク変異株の監視体制を強化した。監視結果は、予測の妥当性を支持した。④北大・人獣共通感染症リサーチセンターと共同で、予測精度向上に有用な大規模計算の実施基盤を整えた。以上の活動により、計算科学をリスク管理に活用する連携・技術基盤の強化が着実に進んだ。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルスのハイリスク株早期検出は、国際的な重要課題である。しかし、現行の監視体制は種々の課題を抱える。第一に、未報告の変異が検出された時、そのリスクを論理的に評価できない。第二に、将来の流行株を論理的に予測できない。第三に、海外で発生した新型ウイルスの迅速入手と性質決定は、カルタヘナ議定書の履行に伴い困難な状況にある。第四に、ハイリスク変異同定を目的とする組換えDNA実験は、保安上の観点から実施が難しい事態がしばしば生じている。

新たに発生したウイルスのリスク、あるいは今後生じうるリスク変異を論理的に推定するには、新たな手法の開発が必須であ

る。そこで本研究では、計算科学のもつ予測能力に着目し、構造シミュレーションの諸技術をリスク管理体制の強化に活用する新たな連携体制と手法の構築を研究した。

### B. 研究方法

(1) リスク予測と検証：本研究では、ウイルスの感染力と宿主指向性を担うHA、NAタンパク質を解析対象とし、ヒト-ヒト伝播能のリスク予測、及び今後生じうるリスク変異の予測を実施した。予測には、分子モデリングと *in silico* 変異導入解析を用いた。研究代表者と共同で、サーベイランス等により予測の妥当性を検証した。

(2) 連携体制と技術基盤の強化：本研究では、研究代表者と共同で変異検出→流行リ



スク予測→監視による検証、の過程を積み重ねることでリスク管理体制を強化した。また、北大・人獣共通感染症リサーチセンター伊藤教授と共同で、分子動力学法等の大規模計算の実施基盤を強化した。

### C. 研究結果

平成 25-26 年度は、疫学・ウイルス学・計算科学の連携体制を整えながら、予測と検証を積み重ねた。平成 27 年度は、大規模計算の実施基盤を整えながら、今後の予測精度向上に備えた。

(1) 疫学・ウイルス学・計算科学の統合解析環境の整備：リスク予測の前提として、不断に発生する変異株の変異情報、並びに日々理解の深まるウイルスタンパク質の機能情報の入手が不可欠である。そこで、国立感染症研究所・インフルエンザ研究センター・第一室との共同研究を実施することで、インフルエンザの疫学・ウイルス学の最新情報を円滑に入手する協力体制を構築した。

(2) 予測と検証の積み重ね：この連携基盤を用いて、予測と検証を積み重ねた。

①平成25年11～12月、札幌でA(H1N1)pdm09オセルタミビル/ベラミビル耐性株が発生した。この耐性株は、NAタンパク質に未報告の変異(N386K)を持ち、構造安定化によりヒト-ヒト伝播能が昂進している危険性が疑われた。そこでこの株の感染拡大リスクを予測した。構造安定性の*in silico*解析によりN386Kに構造安定化の効果がないことが判明し、この株の感染は二次変異を獲得しない限り終息すると予測した。この予測はサーベイランスにより確認された (Takashita E et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 59:2607-201, 2015)。②平成25年5月に中国でトリIFV A (H7N9)のヒト

感染事例が発生した。この株はヒト-ヒト伝播能が低く、流行には至らなかった。しかし、二次変異を蓄積することで、ヒト-ヒト伝播効率の高い株が生じる可能性が危惧され、早急に二次変異の種類と位置を調べて監視を強化する必要に迫られた。ヒト-ヒト伝播効率を高めうる変異として、HAタンパク質の受容体指向性変化(ヒト型シアル酸への指向性の向上とトリ型シアル酸への指向性の低下)、及びHA構造の安定化が報告されている。*In silico*構造解析により、これらの物性変化をもたらす変異を包括的に同定し、変異情報を代表者に提供して監視を強化した。その後、中国で新たな変異を獲得したA (H7N9)の感染事例が複数回報告された。しかしいずれも予測した変異を持たず、それらの変異による受容体指向性変化と構造安定化も*in silico*解析では認められないことから、感染拡大のリスクは低いと予測した。その後の継続的な監視により、これらの予測の妥当性が確認された。

(3) MD simulationの実施環境整備：2013年にノーベル化学賞を受賞した分子動力学法(MD simulation)を用いれば、溶液中のタンパク質構造の動的挙動を原子レベルで解析できる。タンパク質の動的振る舞いは、分子の相互作用と機能発現に重要な働きをすることがわかっている。したがってMD simulationは、変異ウイルスの受容体指向性、薬剤感受性、抗原性・抗体感受性等の性質変化の予測の精度向上に役立つと考えられる。我々は、既にHIVのエンベロープタンパク質の適応進化の研究(薬剤耐性、中和抗体逃避、感染・増殖能昂進などの研究)にこの技術を応用して論文に公表している。そこで最終年度は、インフルエンザウイルスHAタンパク質三量体のMD simulationの実施基盤を構築した。

MD simulationの実施には高性能コンピュータの存在が不可欠である。MDの高速計算を可能とする高性能サーバは、高額で容易に購入できない。これまでに病原体ゲノム解析研究センターに整備したサーバは、通常は種々の病原体分子の構造解析研究業務に使用しているため、要事に使用できる保証が無い。この問題を解消するために、スーパーコンピュータとMD simulationの実施環境をもつ北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターのバイオインフォマティクス部門（伊藤教授）との共同研究体制を構築した。これにより、病原体ゲノム解析研究センターにおいて、人獣共通感染症リサーチセンターの所有するスーパーコンピュータを使用してMD simulationを実施し、成果を共有することが可能となった。

(4) 北大・感染研の連携体制整備：人獣共通感染症リサーチセンターのスーパーコンピュータを用いて糖鎖付加型HA三量体分子のMD simulationを開始した。これにより、病原体ゲノム解析研究センターをハブとしてインフルエンザウイルス研究センター、北大・人獣共通感染症リサーチセンターが連携する対インフルエンザの新たな連携体制の発足に寄与した。

(倫理面への配慮)

該当無し。本研究は、計算機を用いた解析を実施するものである。

#### D. 考察

本研究の推進により、株サーベイランス体制強化に資する2つの成果が得られた。

(1) 連携基盤の強化：インフルエンザの疫学・ウイルス学・計算科学の研究を統合的に実施する連携体制の整備が進んだ。これには、国立感染症研究所内連携（インフ

ルエンザウイルス研究センターと病原体ゲノム解析研究センター）と感染研・所外の連携（北大・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門）が含まれる。これにより、計算・情報科学を取り入れてインフルエンザウイルスのリスク管理を進める連携基盤が着実に強化された。今後も共同研究等を通じて継続的に強化していくことが重要と考える。

(2) 技術基盤の強化：新たに発生した変異ウイルスのリスク評価、並びにハイリスク変異の予測を実施し、さらにサーバイランスでその妥当性を検証することで、予測に使える諸技術の基盤強化が進んだ。また、計算機環境を所外に確保することで、ウイルス粒子上の糖鎖付加型 HA 三量体分子の分子動力学計算を実施する計算機環境が強化された。これにより、変異による HA の物性変化を詳細に解析することが可能になり *in silico* 予測の精度向上が期待される。

#### E. 結論

本研究により、計算・情報科学を取り入れてインフルエンザウイルスのリスク管理を進める連携体制と技術基盤の強化が着実に進んだ。今後もこの連携を継続的に強化していくことが論理的なウイルスのリスク管理につながると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013–2014

influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:2607-2017.  
(2) 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. *Journal of Infection and Chemotherapy* (2013) 19:891-895.

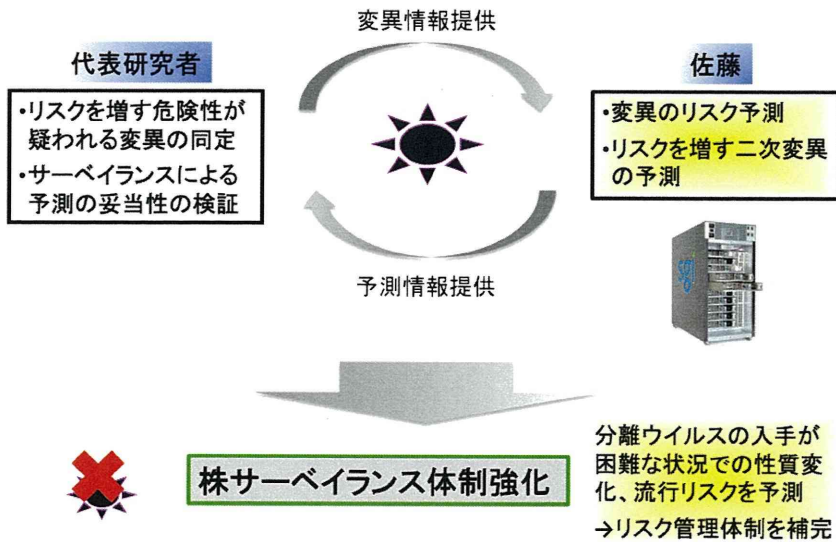
## 2. 学会発表

(1) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所. 2013/14 シーズンにおけるNA阻害剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日 (月-水)、横浜.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

計算科学を株サーベイランスに活用する連携・技術基盤の構築



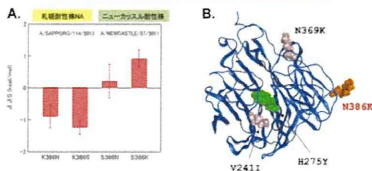
変異のリスク予測とサーベイランスによる検証

(1) 変異ウイルス伝播リスクの予測

札幌 IFV A (H1N1)pdm09薬剤耐性株

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



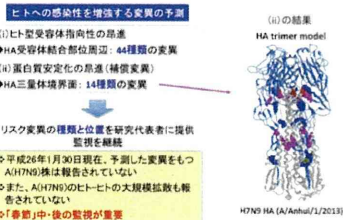
- NA 386K変異に構造安定化の能力は無い
- HAに抗原変異は無い
- 構造生物学的観点からは流行リスクは小

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:2607-2617, 2015

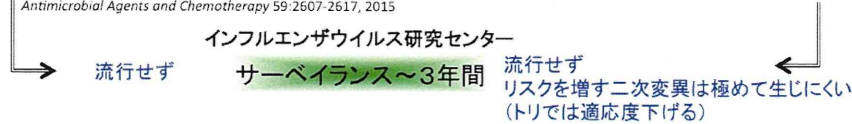
(2) 伝播リスクを高める二次変異の予測

中国 トリIFV A(H7N9)

鳥インフルエンザウイルスA(H7N9)のリスク変異の予測



- 流行拡大を招くHA二次変異を58種予測
- ◆ヒト型受容体指向性の増強変異44種
- ◆構造安定化に寄与する補償変異候補14種



## 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ールの改良を行い、*de novo* でのアセンブル、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、増殖性等に関係す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 によるアセンブル、の順序で行った。得られた塩基配列もしくはアミノ酸配列をもとに、近隣結合法および最尤法で分子系統解析を行い、薬剤耐性

変異等の出現や変遷について分析を行った。

高リスクが疑われる株や新型コロナ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 protocols 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 AGCAAAAGCAGG 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。

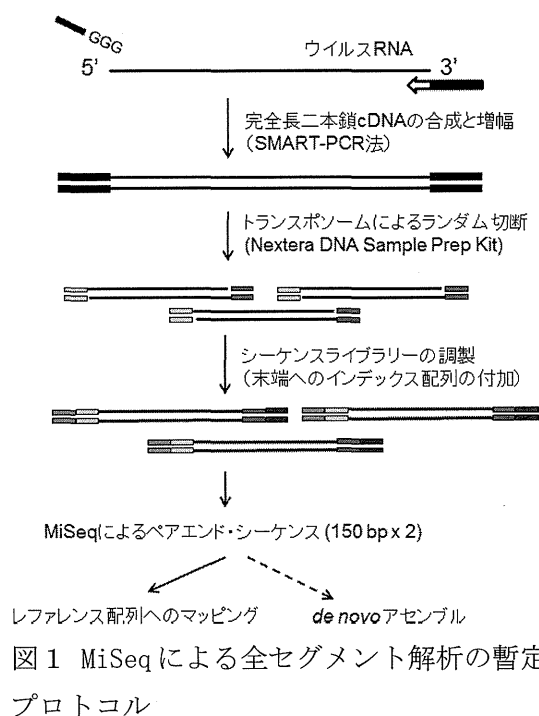


図1 MiSeqによる全セグメント解析の暫定プロトコル

(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SEMB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SEMB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。

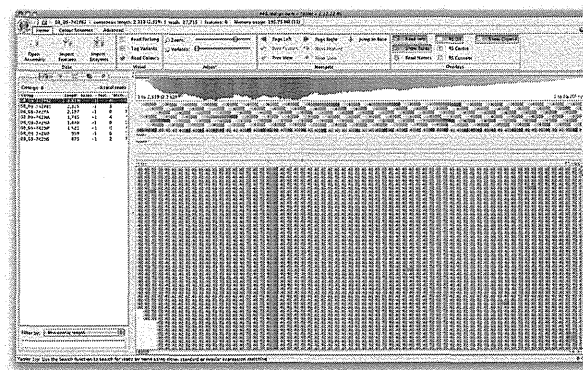


図2 アSEMBル状況の例 (PB2セグメント末端部分の拡大)

(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。



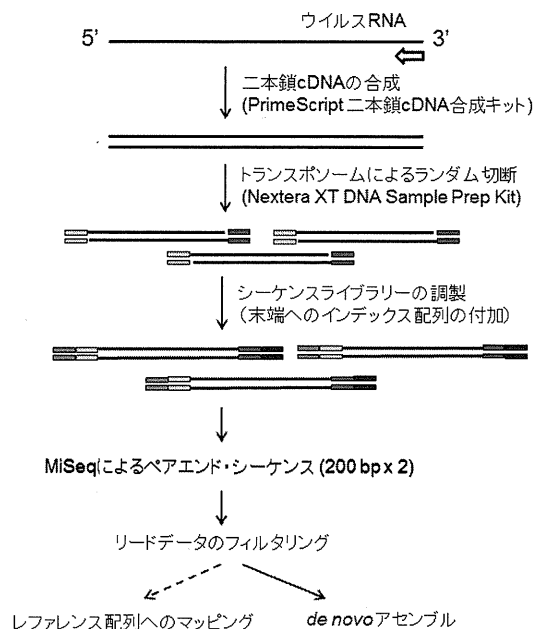


図3 改良後の全セグメント解析プロトコル

### 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

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 pinoresinol 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<sup>T</sup>. *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<sup>T</sup> 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

## 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行に関する研究

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

インフルエンザ A(H1N1)pdm09 の予防および治療には抗インフルエンザ薬の NA 阻害剤が用いられる。NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異 (H275Y) をもつ NA 阻害剤耐性ウイルスは国内外で散発的に検出されており、我々は全国地方衛生研究所と共同で、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。札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制を強化したところ、2013 年 2 月中旬までに、490 株の解析株中 41 株の耐性ウイルスが検出され、検出率は 8% に達することが明らかになった。国内外の A(H1N1)pdm09 耐性ウイルス検出率は、過去数シーズンにわたって 1-2% 程度であり、8% の検出率は憂慮すべき事態である。現在のところ、耐性ウイルスの検出は札幌市を中心とした地域流行にとどまっているが、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。国内における耐性ウイルス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ために、耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

### A. 研究目的

日本国内においてインフルエンザ A(H1N1)pdm09 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。世界各国で分離される A(H1N1)pdm09 ウイルスのほとんどは上記の抗インフルエンザ薬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・ペラミビル耐性ウイルスが検出されている。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、国内における薬剤耐性ウイルスの発生状況を迅速

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ている。

札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制の強化を図った。

### B. 研究方法

全国地方衛生研究所において、A(H1N1)pdm09 ウイルスの NA 遺伝子解析