

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定が行なわれている。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 ヶ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き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の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., Okamoto, 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.* 66:549-551, 2013

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。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。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。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。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により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。

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)。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.

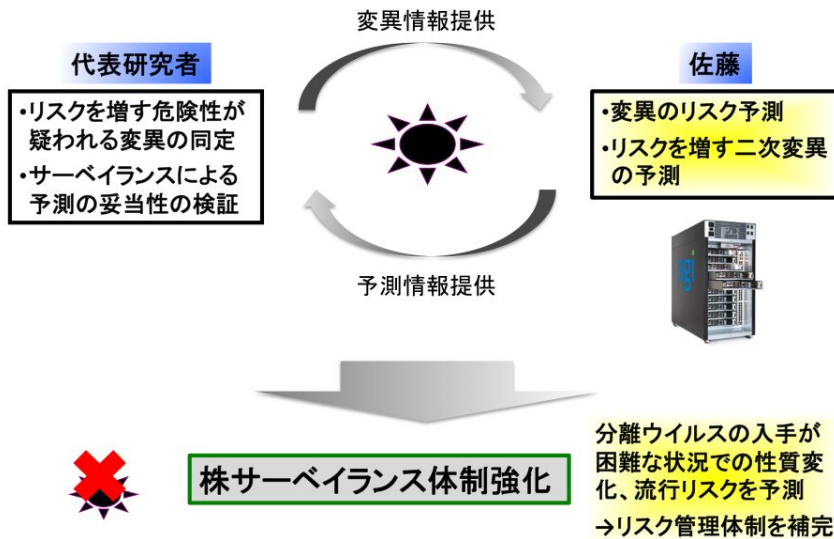
2 . 学会発表

(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



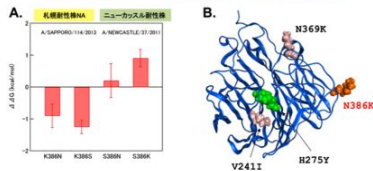
変異のリスク予測とサーベイランスによる検証

(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



386K: NA蛋白質を不安定にする
386N/S: 同程度に安定(Sがやや安定)

- 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

インフルエンザウイルス研究センター

流行せず

サーベイランス~3年間

流行せず

リスクを増す二次変異は極めて生じにくい
(トリでは適応度下げる)

(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

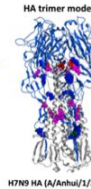
ヒトへの感染性を増強する変異の予測

- (i) ヒト型受容体指向性の原遺
- ◆HA受容体結合部位周辺: 44種類の変異
- (ii) 蛋白質安定化の原遺(補償変異)
- ◆HA三量体境界面: 14種類の変異

リスク変異の種類と位置を研究代表者に提供
監視を継続

- ◆平成28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
- ◆また、A(H7N9)のヒト-ヒトの大規模拡散も報告されていない
- ◆「春節」中・後の監視が重要

(iii)の結果



- 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 Protokol 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。

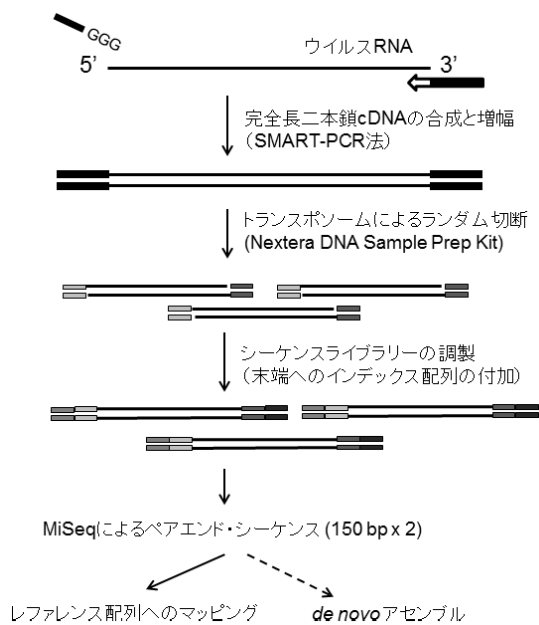


図1 MiSeqによる全セグメント解析の暫定プロトコル

(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。

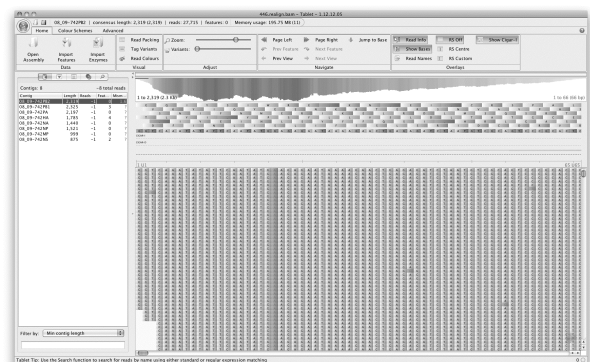


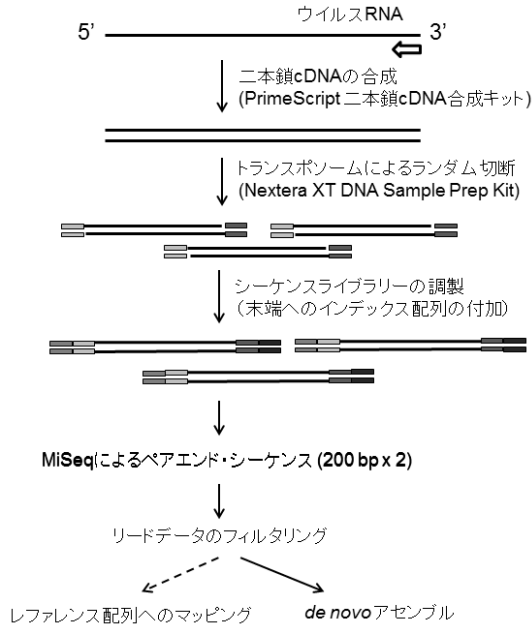
図2 アSEMBル状況の例(PB2セグメント末端部分の拡大)

(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、本年度は以下のからの点について、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

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。

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。

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、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 NCBI 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 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^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 degrader. *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

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

によるH275Y耐性変異の1次スクリーニングを行った。検出されたH275Y耐性変異ウイルスに関しては、引き続き国立感染症研究所において、詳細な遺伝子解析および抗原性解析を行った。さらに、MUNANA基質を用いた蛍光法によって、H275Y耐性変異ウイルスのオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、 IC_{50} 値を算出した。

C . 研究結果

2013年2月中旬までに、全国31都道府県の43地方衛生研究所で490株のA(H1N1)pdm09ウイルスが解析され、そのうち41株のH275Y耐性変異ウイルスが検出された。H275Y耐性変異ウイルスはいずれもオセルタミビルおよびペラミビルに対して著しく感受性が低下していた。一方で、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。オセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出された患者のほとんどは検体採取前に抗インフルエンザ薬の投与を受けておらず、薬剤により患者の体内で耐性ウイルスが選択された可能性は否定される。国内における薬剤未投与例からの耐性ウイルスの検出率はシーズン毎に増加傾向にあり、海外の状況も同様である。

2013/2014シーズンには、米国および中国においてもH275Y耐性変異ウイルスの検出が相次いで報告されている。日本国内で検出された耐性ウイルスの詳細な遺伝子解析から、国内の耐性ウイルスは中国の耐性ウイルスと共通の祖先に由来する可能性が示唆された。また、2009年の(H1N1)2009パンデミックの際にヨーロッパの重症患者の一部で報告された、鳥型レセプターへの結合性を高めるようなヘムアグルチニン(HA)遺伝子の変異(D222G、Q223R)は起こって

おらず、耐性ウイルスの病原性が増強している所見はない。

国内で分離されたオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスについて抗原性解析を行った結果、2013/14シーズンのワクチン株A/California/7/2009の抗原性と一致していることが明らかになった。したがって、今シーズンのワクチンは、オセルタミビル・ペラミビル耐性A(H1N1)pdm09ウイルスに対する有効性が期待される。

D . 考察

国内外におけるH275Y耐性変異ウイルスの検出率は、過去数シーズンにわたって1-2%程度であったが、2月中旬までの2013/2014シーズンの国内における耐性ウイルスの検出率は8%に達した。一方、札幌市における耐性ウイルスの検出率は83%、北海道全体における耐性ウイルスの検出率は79%であった。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おり、北海道以外の地域における耐性ウイルスの検出率は3%となる。しかし、札幌市を訪問後に居住地で発症し、札幌で流行する耐性ウイルスと遺伝的に同一の耐性ウイルスが検出される症例が増えており、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。

E . 結論

国内では、札幌市を中心にH275Y耐性変異ウイルスの検出が続いている。H275Y耐性変異をもつインフルエンザウイルスに関して、小児ではオセルタミビル投与群と非投与群の間で有熱期間に差がなかったという報告があり、抗インフルエンザ薬の投与に際しては、各地域での耐性ウイルスの検出状況に注意を払う必要がある。したがって、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、引き続き全国地方衛生研究所と国立感染症研究所における耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

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, 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.Eisfeld, 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

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

「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%、B/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%を越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

人群では、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の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

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 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし

- 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

表 1 . 2013-2014 年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

Titer of A/California/7/2009(H1N1) responses after influenza vaccine									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	57.4	91.9	2.1	71.0	93.0	9.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	45.1	81.2	2.4	58.7	78.3	21.7
Titer of A/Texas/50/2012(H3N2) responses after influenza vaccine									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	54.3	96.5	2.2	70.0	93.0	18.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	33.4	73.1	3.2	52.2	84.8	30.4
Titer of B/Massachusetts/2/2012(Yamagata) responses after influenza vaccine									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	49.9	69.2	1.5	74.0	86.0	6.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	17.2	33.9	2.9	26.1	52.2	28.3

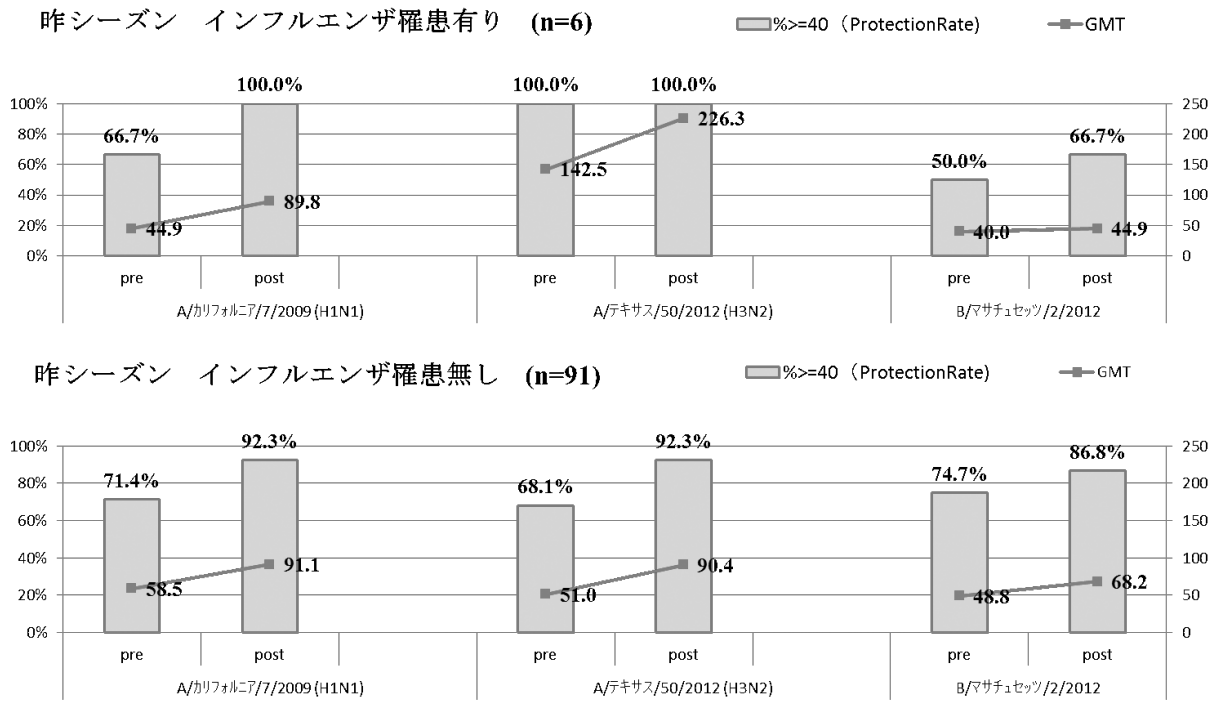


図1. 昨シーズンの成人（スタッフのみ）インフルエンザ罹患者と非罹患者のHI抗体価のワクチン接種前後の抗体価の推移

表2. インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

インフルエンザワクチン副反応（複数回答）

	発疹	発赤	腫れ	痛み	その他
成人層(n=100)	3	48	41	27	8
%	3.0%	48.0%	41.0%	27.0%	8.0%
高齢者層(n=46)	0	22	3	1	0
%	0.0%	47.8%	6.5%	2.2%	0.0%
全体(n=146)	3	70	44	28	8
%	2.1%	47.9%	30.1%	19.2%	5.5%

表3. 2013-14年シーズン新潟大学におけるインフルエンザ検出状況（2014年2月5日現在）

調査地域	総検体数	A型			B型		陰性	型別不可	調査中		
		H1N1pdm09 内訳			H1N1pdm09	H3N2				ビクトリア系統	山形系統
		感受性	H275Y変異	合計割合							
北海道	17	0	0	0.0%	0	2	0	0	12	0	3

成人層および高齢者層に対する 2014-15 年季節性インフルエンザ ワクチン接種後の抗体価反応

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

近藤大貴、菖蒲川由郷、日比野亮信、八神錬 新潟大学大学院医歯学総合研究科

尾ヶ井マサヨ

女池南風苑・看護介護科長

樋熊紀男

女池南風苑・施設長

研究要旨

2014-2015 年シーズンの三価インフルエンザワクチン接種前後の成人・高齢者の A(H1N1)pdm09 抗原、A(H3N2)抗原、B(山形)抗原に対する血清抗体価の調査を行った。スタッフ 103 名(平均年齢 43 才)と、高齢入所者 46 名(平均年齢 86 才)のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集素阻害反応(HI 法)で測定し、ワクチン接種による変化を評価した。成人では A(H1N1)pdm, A(H3N2), B いずれも接種後には 70-90%を超える有意抗体価 (HI 抗体 40 倍以上) の保有率を認め、GMT の値も上昇した。高齢者では接種後に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)は、80%以上の有意抗体価 (HI 抗体 40 倍以上) の保有率を認めたが、B 型は接種後に保有率が 52%に上昇したものの、やや反応が悪い傾向があった。接種後の副反応については、当該施設の約半数が発赤を訴えたが、重篤な全身反応は認められなかった。全体的にみると今シーズンのワクチンは、免疫原性の国際的な評価基準を満たしていた。

さらに、前シーズン(2013-2014)において本人が罹患したと申告したスタッフの 6 名のうち 3 名は、A(H1N1)pdm の接種前の HI 抗体価が 160 倍以上と高く、A(H1N1)pdm に罹患したと推測された。

2015 年 1 月 29 日現在、当教室では全国 6 府県(北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県、沖縄)の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を 331 件採集し、A(H3N2)が 98 件(98.0%)、A(H1N1)pdm が 2 件(2.0%)、B 型が 0 件(0.0%)と、A/H3N2 がほとんど占めた。A(H1N1)pdm 2 件は全て薬剤感受性であった。

A. 研究目的

流行するインフルエンザウイルスは、抗原性や型・亜型が年ごとに変化するため、インフルエンザワクチンと流行するインフルエンザの抗原性が一致しないことがしばしばある。このため、WHO が 1 年ごとに

次のシーズンに流行するウイルス株を予測しその情報をもとに、次のシーズンのインフルエンザのワクチン株が決定される。2014-2015 年シーズンの日本のインフルエンザワクチンは、三価のインフルエンザワクチン、

* A/California/7/2009(H1N1)pdm09

* A/New York/39/2012(H3N2)

* B/ Massachusetts/2/2012(山形)

が使用されている。本調査では、高齢者施設のスタッフ(成人)、入所者(高齢者層)に対して、2014-2015 シーズンにおけ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)で測定し、ワクチン接種による HI 抗体価の変化を評価した。また、スタッフについては、聞き取り調査による前シーズンのインフルエンザの罹患の状況と HI 抗体価との関連性をみた。

さらに、ワクチン接種後の副反応を検討した。

B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、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、2014 年 11 月にデンカ生研社製の 2014-2015 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。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/ニューヨーク/39/2012)、B 抗原(B/マサチューセッツ/02/201)を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設のスタッフを“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、スタッフについては、聞き

取り調査による前年度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、罹患したと答えた群で、罹患したと答えた型と、今回測定した HI 抗体価を比較した。

接種後 48 時間以内の副反応について自己申告(入所者の場合はスタッフの観察による)にて、「発疹、発赤、腫れ、痛み、その他(全身症状)」の有無を報告してもらい、スタッフ群と入所者群で副反応症状を訴えたものの割合を検討した。

(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

成人群のペア血清は 103 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 43.2±11.7 歳、高齢者群の平均年齢は 86.4±8.2 歳であった(表 1)。

40 倍以上の抗体価保有率は、成人群で A/California/7/2009 接種前 85.4%、接種後 98.1%、A/New York/39/2012 接種前 85.4%、接種後 96.1%、B/Massachusetts /2/2012 接種前 74.8%、接種後 78.6%であり、3 種の抗原共に前値から国際基準の 70%を超していた(表 1、図 1)。

一方、高齢者では A/California/7/2009 接種前 80.4%、接種後 89.1%、A/New York/39/2012 接種前 71.7%、接種後 91.3%、B/Massachusetts/2/2012 接種前 39.1%、接種後 52.2%であり、A/H1N1pdm09 と A/H3N2 は前値も高く接種後の抗体価も国際基準の 60%を超していた。しかしながら、B 型は結果的に 52%に保有率が上昇したものの国際基準の 60%にはわずかに及ばなか

った。

成人群のワクチン接種前後のHI抗体価の幾何平均 (GMT) については、A/California/7/2009接種前94.0、接種後146.6、A/New York/39/2012接種前68.1、接種後130.7、B/ Massachusetts/2/2012接種前43.7、接種後51.3であった(表1, 図1)。

Mean fold increase は、A/California/7/2009 2.0、A/New York/39/2012 2.5、B/Massachusetts/2/2012 1.2と、国際基準(成人層mean fold increase >2.5)の値と比べるとやや低めであったが、3種の抗原とも接種前が高かったため、接種後は抗体価の上昇が頭打ちになったと推察される。

一方、高齢者のHI抗体価の幾何平均は、A/California/7/2009接種前80.0、接種後116.6、A/New York/39/2012接種前47.2、接種後98.8、B/ Massachusetts/2/2012接種前22.2、接種後35.5であった。

Mean fold increase は、A/California/7/2009 1.8、A/New York/39/2012 2.8、B/Massachusetts/2/2012 2.1であった。A(H3N2)とB型では、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。その一方、A(H1N1)pdm09は、接種前の値が高かったため、接種後の反応が国際基準に及ばなかったと考えられる。

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、成人群では、A/California/7/2009で13.6%、A/New York/39/2012で20.4%、B/Massachusetts/2/2012で1.0%であった(表1)。高齢者群ではA/California/7/2009で15.2%、A/New York/39/2012で28.3%、B/Massachusetts/2/2012で10.9%と数値上、高齢者群のほうが反応は良い傾向にあったが、mean fold

increaseと同様、成人層は高齢者層より接種前のHI抗体価が高い為、抗体価反応率が低くなったと考えられる。

次に、成人群で、前シーズン(2013-2014)にインフルエンザに罹患したと申告した6名(罹患群)のHI抗体価を解析した(表2)。自己申告でA型に罹患したと申告した2名のうち1名(No.1)はA/California/7/2009の接種前抗体価が320倍と高かったが、もう1名はA/California/7/2009とA/New York/39/2012のHI抗体価が、共に80倍でどちらに罹患したのか判断できなかった。一方、不明と答えた2名はA/California/7/2009の抗体価が160倍以上と高く、先シーズンはH1N1pdm09に罹患したと考えられた。B型に罹患したと答えた2名(No.4, 6)は両名ともHI抗体価が40倍と上昇は認めなかった。

ワクチン接種後の副反応について、成人103名と高齢者46名で比較したところ、最も多い副反応は成人層、高齢者共に局所の発赤でそれぞれ49.5%、28.3%であった(表3)。次に多いのが局所の腫れで、成人で35.0%、高齢者で4.3%であった。成人では局所の痛みが31.1%についても割合が高かった。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]

2014-15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

新潟大学国際保健学分野では、全国6道府県(北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県、沖縄県)の医療機関と連携し、インフルエンザの調査を行っている。2015年1月29日現在では、インフルエンザ疑いの患者を、迅速診断キットでスクリーニングし、同意を得たのちに鼻腔・咽頭検体を331件

採取した。採取した臨床検体または MDCK 培養株から RNA を抽出し、cDNA を合成したのちに、Real-Time PCR (サイクリングアンプ法) にて A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型山形系統、B 型ビクトリア系統を判別した。

結果は A(H3N2) が 98 件 (98.0%)、A(H1N1)pdm09 が 2 件 (2.0%) と、ほぼ A(H3N2) のみの検出結果であった。A(H1N1)pdm 2 件は全て薬剤感受性であった。B 型はキット陽性が 1 例あったが、現在当教室で検査中である (表 4)。

D. 考察

成人群では、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B いずれに対してもワクチン接種後に 40 倍以上の HI 抗体保有率は 70-90% を超え、インフルエンザの罹患が予防できる可能性が高い。しかし 3 種類の抗原ともに接種前からすでに抗体保有率が高かったことも影響していると考えられる。該当施設ではほとんどのスタッフがワクチンを接種しており、接種前から抗体を保有していたことが原因と考えられる。

高齢者群においては、A/H1N1pdm09、A/H3N2 に対して、接種後 80-90% の高い HI 抗体保有率を認めたが、B 型では接種前 39.1% と低く、接種後も 52.2% とやや低めであり、高齢者層で B 型の抗体保有率が低い傾向は前年度の結果と変らなかった。B 型は、A 型に比べてなぜ HI 抗体価が低いのか疑問が残る。昨シーズンに B 型に罹患したと自己申告したスタッフの HI 抗体価前値も低めであったこともあわせ、HI 抗体で現在のワクチン株に対する免疫原性を正しく評価できているかわからず、今後検討すべきと考えられる。しかしながら、全体的にみると今シーズンのワクチンは、免疫原

性の国際的な評価基準を満たしていた。流行株の抗原性が一致すればワクチンによる一定程度の感染回避が見込まれる。

副反応については、約半数が局所の発赤を報告したが、その割合は例年とほぼ同様であり、かつ重篤な副反応はみとめられなかった。このため、インフルエンザワクチンは安全に接種できると言える。

当教室が行っている 2014-2015 年シーズンのインフルエンザ調査によると、全国的に A(H3N2) の流行がみられる。国立感染症研究所の発表でも全国的に A(H3N2) が優勢である。また、今シーズンの A(H1N1)pdm09 はオセルタミビル感受性であり、NA 蛋白は H275 である。昨シーズンにみられたオセルタミビル耐性株は検出されていない。

E. 結論

2014-2015 年シーズンのワクチン接種後、成人、高齢者共におおむね良好なワクチン効果が得られた。重篤な副反応はみられなかった。インフルエンザは毎年流行株が異なるため、今後もワクチン接種が必要である。調査を行った情報は、次のシーズンのワクチン株の選定のために有益であるため、今後も調査の継続が必要である。

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

- 論文発表
 - 齋藤玲子、近藤大貴、日比野亮信、八神錬、菖蒲川由郷 抗インフルエンザ薬の現状と展望 化学療法の領域. 30 巻 12 号 96-102 頁, 2014 年
 - 齋藤玲子、近藤大貴、日比野亮信、八

神鍊、菖蒲川由郷 抗インフルエンザ薬の耐性とその対策 医薬ジャーナル. 50 巻 10 号 101-105 頁, 2014 年

2) 齋藤 玲子 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性ウイルス 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 2014 年 10 月 東京都

2. 学会発表

1) 近藤 大貴、日比野亮信、八神鍊、菖蒲川由郷 Clyde Dapat、川島崇、木村眞司、佐藤勇、真崎宏則、西藤岳彦、竹前喜洋、鈴木宏、齋藤玲子. 2013-14 年シーズンに本邦で検出されたインフルエンザ A(H1N1)pdm09 H275Y 変異株 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 神奈川県横浜市

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

表 1 . 2014-2015 年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

Titer of A/California/7/2009(H1N1) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	94.0	146.6	2.0	85.4	98.1	13.6
	User	N=46	86.4±8.2	80.0	116.6	1.8	80.4	89.1	15.2
Titer of A/New York/39/2012(H3N2) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	68.1	130.7	2.5	85.4	96.1	20.4
	User	N=46	86.4±8.2	47.2	98.8	2.8	71.7	91.3	28.3
Titer of B/Massachusetts/2/2012(Yamagata) responses after influenza vaccine									
Facilities	Object person	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increasing HA titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=103	43.2±11.7	43.7	51.3	1.2	74.8	78.6	1.0
	User	N=46	86.4±8.2	22.2	35.5	2.1	39.1	52.2	10.9

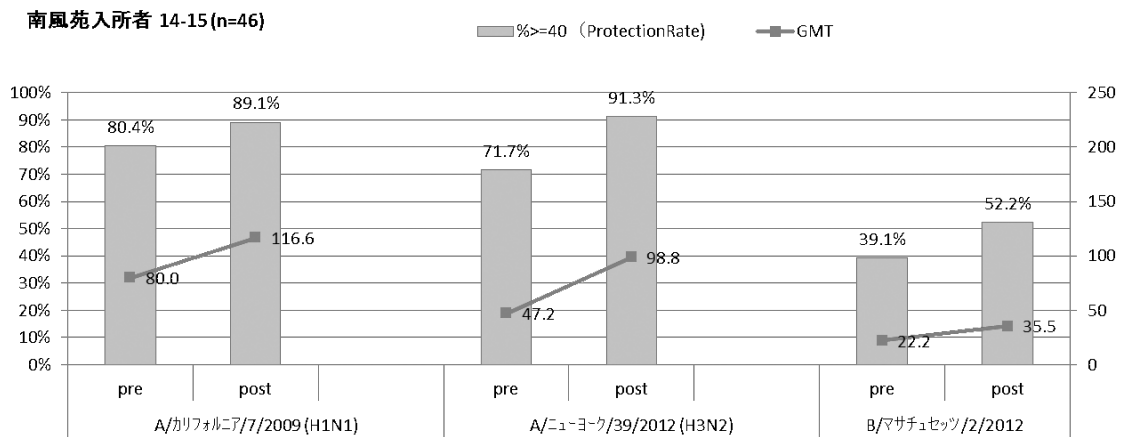
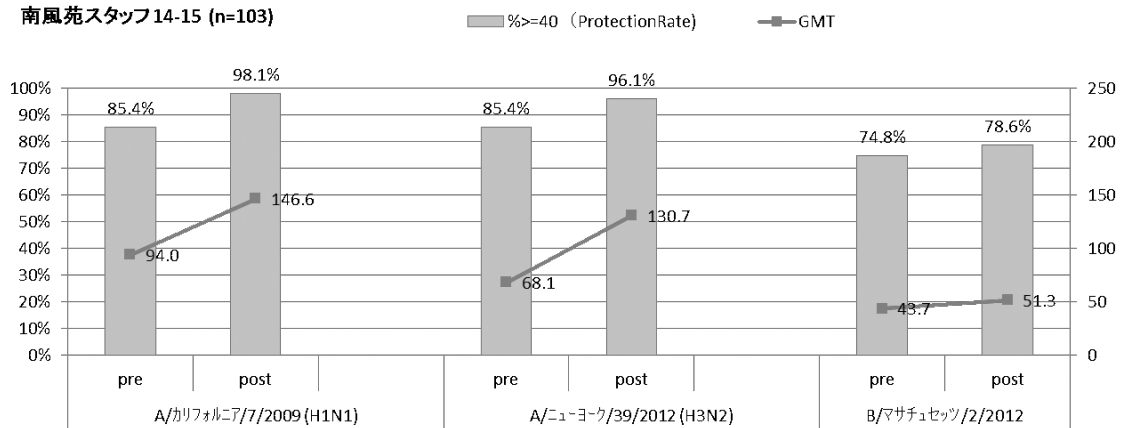


図1 .成人層(スタッフ)と高齢者層(入所者)のワクチン接種前後のHI抗体価の推移(40倍以上の抗体価保有率%と、抗体価幾何平均GMT)

表2 .昨シーズンにインフルエンザ罹患ありと回答したスタッフのHI抗体価(n=6)

番号	自己申告インフルエンザ罹患	A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)		A/ニューヨーク/39/2012 (H3N2)		B/マサチューセッツ/2/2012 (山形系)	
		pre	post	pre	post	pre	post
1	A	320	640	20	80	80	80
2	不明	640	640	160	320	40	40
3	A	80	160	80	160	40	80
4	B	40	40	10	20	40	40
5	不明	160	320	20	80	40	80
6	B	40	40	160	320	40	40

表3．インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

	発疹	発赤	腫れ	痛み	その他
スタッフ(n=103)	3	51	36	32	7
	2.9%	49.5%	35.0%	31.1%	6.8%
入所者(n=46)	0	13	2	0	0
	0.0%	28.3%	4.3%	0.0%	0.0%
全体(n=149)	3	64	38	32	7
	2.0%	43.0%	25.5%	21.5%	4.7%

表4．2014-15年シーズン新潟大学におけるインフルエンザ検出状況（2015年1月29日現在）

地域	初診時 臨床検 体	迅速診断 キット 結果			分離株							陰性	検 査 中
		A	B	陰性	A/H1N1 pdm09 (%)	H275Y (%)	A/H3N2 (%)	B Victoria (%)	B Yamagata (%)	A+B (%)	合計		
北海道	0	0	0	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0	0	0
新潟	235	170	0	65	1 (2.1%)	0 (0.0%)	47 (97.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	48	2	185
群馬	13	12	0	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12	0	1
京都	10	10	0	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10	0	0
長崎	72	71	1	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	29 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	29	1	42
沖縄	1	1	0	0	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1	0	0
合計	331	261	1	66	2 (2.0%)	0 (0.0%)	98 (98.0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100	3	228