

分担研究報告書

噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンに関する研究

分担研究者 堺 春美 東海大学医学部助教授

研究要旨

噴霧接種不活化インフルエンザHAワクチンは皮下接種と少なくとも同等に全身免疫機構を刺激することが明らかとなった。インフルエンザワクチンの有効性はフィールドによって毎回異なるが、今回の研究では、共同生活をしている学童35名ならびに成人29名を対象に不活化インフルエンザHAワクチンの噴霧接種を行いその効果を検討した。感染者は、学童でのみ発生し、A/北九州 H3N2で4/35（有症状者は3/35）、B/三重で3/35（有症状者は2/35）と低率であった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはきわめて変異を起こし易いRNAウイルスである。流行毎にウイルスの遺伝子配列がわずかにあるいは大幅に異なるために毎年の流行に合わせたワクチンを対象者全員に毎年接種しなければならない宿命を負っている。インフルエンザに罹患して流行の輪を形成するのは学童であり、社会の生産性が低下するのは青壮年層における流行である。罹患して重症となるのは乳児、高齢者、ハイリスク者である。すなわち、インフルエンザワクチンは、乳児から高齢者まで、そして、健康者からハイリスク者まで、幅広い接種対象を有する。より受け入れられ易いワクチンであり、また、粘膜免疫機構を刺激できるワクチンとして噴霧型インフルエンザワクチンが考えられる。現在のところ、実用化可能な噴霧型インフルエンザワクチンは、低温適応変異インフルエンザウイルス生ワクチンと噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンだけである。

新興・再興感染症としてのインフルエンザを想定した場合に、その対応策として噴霧型インフルエンザワクチンはきわめて有望である。しかし、その場合にきわめて速

やかに安全性の高いワクチンがきわめて大量に供給されることが要求されるという厳しい条件がある。この安全性とは、ワクチンの基本的安全性（たとえばH5を含む遺伝子組み換え株の安全性）と乳幼児やハイリスク者（たとえば特別養護老人ホームの入所者）に対する安全性の両方を意味する。低温馴化遺伝子組み換え株である低温適応変異インフルエンザウイルス生ワクチンは上記2つの安全性の保証ができない。したがって、新型登場に際しての候補ワクチンとして、噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンだけが有望なワクチンとして残される。

現行の皮下接種不活化インフルエンザHAワクチンが疾病の重症化を防止することについては、一般的なコンセンサスがある。噴霧型不活化インフルエンザHAワクチンはそのコンセンサスを基盤としている。

本研究の目的は、不活化インフルエンザHAワクチンの噴霧接種の全身免疫機構刺激効果が皮下接種に匹敵するかどうかを検討することならびに、噴霧接種の感染防御効果を検討することにある。

B. 研究方法

共同生活をしている学童35名に不活化インフルエンザHAワクチンを1週間間隔で各0.5mlずつ噴霧接種した。同じく共同生活をしている成人29名を対象に不活化インフルエンザHAワクチンを1週間間隔で3回噴霧接種した。成人48名を対象に不活化インフルエンザHAワクチンを1月間隔で2回皮下接種した。使用したワクチンは、阪大微研製市販不活化インフルエンザHAワクチンLot.BHA S0328 (A/山形/32/89 H1N1 200 CCA, A/北九州/159/93 H3N2 350 CCA, B/三重/1/93 250 CCA) である。採血はワクチン接種前、接種6週後、流行後の3回行い、血清を-20℃で保存した。

血清HI抗体価は予研法にて測定した。

C. 研究結果

A/山形/32/89 H1N1, A/北九州/159/93 H3N2, B/三重/1/93 の血清HI抗体価の4倍以上の上昇率は、噴霧接種群(学童)ではそれぞれ、9%, 43%, 54%、噴霧接種群(成人)ではそれぞれ、7%, 17%, 30%、皮下接種群ではそれぞれ、4%, 33%, 25%であった。

流行後にさらに血清HI抗体価が4倍以上上昇したのは、噴霧接種群(学童)で、A/北九州 H3N2で4名(うち3名は発熱等の症状あり、1名は無症状)、感染率は、4/35 11%、罹患率は 3/35 9%、B/三重で3名(うち2名は発熱等の症状あり、1名は無症状)、感染率は、3/35 9%、罹患率は2/35 6%であった。噴霧接種群(成人)では、いずれの株についても流行後に血清HI抗体が上昇したものは皆無であった。

D. 考察

噴霧接種群のワクチン接種による血清HI抗体価の4倍以上の上昇率は、噴霧接種群(成人)のA/北九州 H3N2以外のすべてについて皮下接種群を上回っていた。

インフルエンザワクチンの効果は感染防止ではなく、疾病の重症化の予防である。したがって、その効果は接種後の罹患の有無によって判定される。噴霧接種群(学童)における罹患率はA/北九州 H3N2で9%、B/三重で6%と低率であった。噴霧接種群(成人)では全例に感染を認めなかった。

E. 結語

本研究の結果は、噴霧接種不活化インフルエンザHAワクチンは皮下接種と少なくとも同等に全身免疫機構を刺激することを示している。インフルエンザワクチンの有効性はフィールドによって毎回異なるが、本研究においては不活化インフルエンザHAワクチンの噴霧接種を受けた者の罹患率は低率であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Harumi Kuno-Sakai: Innovations in Preventive Vaccination. Asian Medical Journal 41(3);148-152, 1998

2. 学会発表

堺 春美: 特別講演—予防接種の最近の動向。第4回香川岡山感染免疫懇話会、1999.1.24

堺 春美: シンポジウム「インフルエンザ」、噴霧接種インフルエンザワクチン、第40回日本臨床ウイルス学会、1999.5

3. 学会抄録

堺 春美: 噴霧接種インフルエンザワクチン 臨床とウイルス 27(2), 1999 印刷中

分担研究報告書

インフルエンザウイルスの分子系統解析の自動化システムの開発

分担研究者 五條堀 孝 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター長・教授

研究要旨 新規インフルエンザウイルスの遺伝子配列を与えると、データベース中の配列と比較し、マルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成まで自動的に行い表示するシステムの設計と構築を行った。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの基礎研究におけるワクチン開発や臨床現場でのサブタイプの迅速な決定や分子進化学的な解析を助ける事を目的としたインフルエンザウイルス遺伝子ゲノム配列の分子進化学的解析のための自動化システムの開発と遺伝子配列データベースの構築を目的とする。

B. 研究方法

本年度はインフルエンザウイルスデータベースの設計と基本的な設定を行った。具体的には、インフルエンザウイルスの遺伝子配列データを国際DNA配列データベースより抽出し、塩基配列、アミノ酸配列についてマルチプルアラインメントや系統樹の作成を行った。また、それぞれのウイルス株の単離年、単離地、サブタイプなどの情報を関係データベースとして整理した。なお、この過程において、システムの設計と設定に関して、分子進化学的な立場からのデータベースの設計に関して、国立遺伝学研究所助手の池尾一穂が協力者として働いた。

C. 研究成果

本年度は、インフルエンザウイルスの遺伝子配列を与えると、自動的にデータベース中の配列と比較し、マルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成までを自動的に行い表示するシステムの設計と構築を行った。また、このシステムを将来、計算機ネットワークを通じて必要な研究者が利用できるように、基礎的な技術の整備を進めた。具体的には、機器の汎用性と価格から判断し、UNIXシステムをPC上で稼働させ、そのシス

テム上で、ゲノム上の位置情報とサブタイプ情報をもとにして各既知の遺伝子配列をサブタイプごとに分類した。さらに、この情報をもとに、サブタイプ群を分子進化学的に細分類した。

D. 考察

本年度の開発研究によって、インフルエンザウイルスの分子進化学的自動解析システムの基礎的仕組みは完成した。しかし、各研究者による利用のための利便性を考えると、計算機ネットワークを用いたシステムへの接続や、計算機の利用に慣れ親しんでいない人にも簡単に利用できるユーザインターフェースの開発・整備がさらに必要である。また、現段階では、分子進化学的に分類を行うのみであるが、今後、新規ウイルスに対するワクチン開発のための機能をさらに加えて、より有効に利用できるように解析システムを作成するとともに、配列データベースの充実をはかる必要がある。

E. 結論

来年度以降は、さらなる解析システムの充実をねらいとして、本システムを利用してインフルエンザウイルス蛋白質の各々のアミノ酸座位における自然選択圧を解析し、宿主の免疫応答からのウイルス粒子の逃避に重要と考えられるアミノ酸座位を進化的側面から明らかにしていく。また、その研究成果を迅速に本システムに反映するような仕組みの開発に取り組む。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, Y., K. Katayama, S. Fukushi, T. Kageyama, A. Ohtani, H. Okamoto, Y. Tanaka, M. Mizokami and T. Gojobori (1999) Slow evolutionary rate of GB virus C/Hepatitis G virus, *J. Mol. Evol.* (in press)
2. Tanaka, Y., M. Mizokami, E. Orito, K.-i. Ohba, T. Kato, Y. Kondo, I. Mboudjeka, L. Zekeng, L. Kaptue, B. Rikandou, P. M'Pele, J. Takehisa, M. Hayami, Y. Suzuki and T. Gojobori (1998) African origin of GB virus C/hepatitis G virus, *FEBS Lett.*, 423, 2, Pp. 143-148
3. Suzuki, Y., T. Gojobori and O. Nakagomi (1998) Intragenic recombinations in rotaviruses, *FEBS Letters*, 427, 2, Pp. 183-187
4. Suzuki, Y. and T. Gojobori (1998) The origin and evolution of human T-Cell lymphotropic virus type I and II, *Virus Genes*, 16, 1, Pp. 69-84
5. Horiuchi, M., Y. Yamaguchi, T. Gojobori, M. Mochizuki, H. Nagasawa, Y. Toyoda, N. Ishiguro and M. Shinagawa (1998) Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus, *Virology*, 249, 2, Pp. 440-452
6. Robertson, B., G. Myers, C. Howard, T. Bretin, J. Bukh, B. Gaschen, T. Gojobori, G. Maertens, M. Mizokami, O. Nainan, S. Netesov, K. Nishioka, T. Shin-i, P. Simmonds, D. Smith, L. Stuyver and A. Weiner (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization, *Arch. Virol.*, 143, 12, Pp. 2493-2503

2. 学会発表

1. Yamaguchi-Kabata, Y. & Gojobori, T. (1998) "Genealogical relationships of viral genes samples at different timepoints from single hosts: a new tool for understanding population dynamics", Fukuoka International Symposium of Population Genetics, Kyushu University (Fukuoka, Japan) 8月20-23日
2. Suzuki, Y. & Gojobori, T. (1998) "New detection

method for positive selection at single amino acid sites" Fukuoka International Symposium of Population Genetics, Kyushu University (Fukuoka, Japan) 8月20-23日

3. 鈴木 善幸、中込 治、五條堀 孝 (1998) 「ロタウイルスにおける遺伝子内組換えとその進化的意義」 (1998) 日本遺伝学会第70回大会、北海道大学、(札幌) 9月23-25日
4. 五條堀 孝(1998) 「病原性ウイルスはどのように進化したか」第13回「大学と科学」公開シンポジウム「遺伝子で生物の進化を考える」日経ホール (東京) 10月13-14日
5. 五條堀 孝(1998) 「病原性ウイルスの分子進化的解析」第3回東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウム「種多様性とゲノム多様化の分子機構」池之端文化センター (東京) 11月20日

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

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

インフルエンザウイルス合併症（脳炎、脳症）の研究

分担研究者 豊田哲也（久留米大学医学部ウイルス学講座主任教授）

共同研究者 濱田信之、原 好勇、古賀まり、升永憲治、辻 克郎、大津 寧、今村
宜寛（久留米大学医学部ウイルス学講座）
加藤裕久（久留米大学医学部小児科学講座）
前田久雄（久留米大学医学部神経精神医学講座）
高橋美津雄、山田達夫（福岡大学医学部内科健康管理学講座）
七種啓行（さいくさ小児科）
中下誠郎、松尾厚子、岩崎啓介（佐世保総合病院）
出口雅経（出口小児科）
上田竜生、野口英太郎（長崎県衛生公害研究所微生物科）
松坂哲應（長崎大学医学部小児科学講座）
喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科疾病制御学講座微生物学教室）

研究要旨

ヒトにおけるインフルエンザウイルスによる全身感染の機構を明らかにする目的で、小児の脳炎・脳症を疑わせる症例におけるウイルス分離と、Nested RT-PCRによるウイルス遺伝子の同定を行った。75%の症例で咽頭拭い液からH3N2型インフルエンザウイルスが分離され、39%の症例でリンパ球（PBMC）画分からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。そのうち、2例においては脳脊髄液中においてもウイルス遺伝子が検出された。尚、今回調べた患者は総て、予防接種を受けていなかった。しかし、PBMC、髄液からのインフルエンザウイルスゲノムの検出と、患者の重症度とは関係がなかった。死亡例を剖検し、脳（脳幹部・小脳）の神経細胞、肺、肝臓、心筋にウイルス抗原を同定した。しかも、この症例では脳脊髄液を含め、調べた総ての臓器（大脳、小脳、肺、腎臓、肝臓）からNested-RT PCRにてウイルス遺伝子が検出され、ウイルス血症、全身感染をおこしていたことが証明された。また、1998年に分離されたウイルスの遺伝子の特徴は、HAの構造もレセプター結合部位、及び抗原決定基の変化以外特に問題となりそうなところはなかったが、NPタンパクのHLA B27拘束性のCTLエピトープに変異があった。今後、HLAとインフルエンザウイルス感染との関連、ウイルスが脳に感染することにより脳炎を起こすのか否かについての解明が課題となる。

A.研究目的

ヒトにおけるインフルエンザウイルス感染は局所粘膜感染の典型とされてきたが、我国では1994年の予防接種法改正によるワクチンの任意接種化にともなう、接種率の激減と相まって、脳炎・脳症の合併例が散発し、全身感染型の経過をとる症例が決して少なくないことが認識されるようになった。我々は、ヒトにおけるインフルエンザウイルスによる全身感染の機構を明らかにする目的で、脳炎・脳症の症例におけるウイルス分離と、Nested RT-PCRによるウイルス遺伝子の同定を行った。

B.研究方法

1、インフルエンザウイルス脳炎脳症患者からのウイルスゲノム断片の検出

長崎県において1998年1月～3月期に流行したインフルエンザウイルス脳炎・脳症の症例28例（年齢：10カ月から11才）の受診時の咽頭拭い液、末梢血リンパ球、血清、髄液を採取した（図1）。咽頭拭い液、血清、髄液からはMDCK細胞を用いてウイルスの分離・同定を行った。分離したウイルスのHAタイターはガチョウ赤血球、および、モルモット赤血球を用いて測定した。また、分離したウイルス、末梢血リンパ球、髄液から酸性グアニジン法によりRNAを抽出し、16 ng～1μgのRNAを鋳型としてRNA PCRキット（宝酒造）を用いて、H3特異的プライマー（H3F-7：ACTATCATTGCTTTGAGC、H3R-1184：ATGGCTGCTTGAGTGCTT）により、Subbaraoの条件でRT-PCRを行った。そしてさらに、ネスト用プライマー（H3-5'n：GCACACTGATAGATGCTCTATTGGG [18-42]、H3-3'n：GGTGCATCTGACCTCA TTATTGAG [895-861]）を用いてNested PCRを行い、H3N2特異的HA遺伝子の検出

を行った（図2）。また、分離ウイルスはHAとNP遺伝子のクローニングを行い、塩基配列を決定した。

インフルエンザ脳炎・脳症？

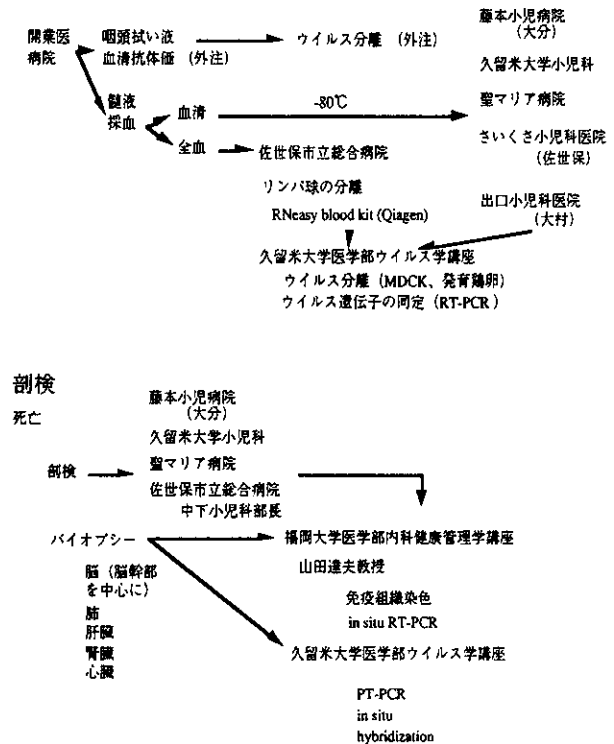


図1 インフルエンザウイルス脳炎・脳症サーベイランス久留米方式

2、剖検（症例10）

症例は2歳女児、2日間の39℃におよぼ発熱・咳嗽に引き続き、意識障害、ふらつき、歩行障害、突然の呼吸停止を来し、蘇生処置されたが、全経過7日で死亡した。死後、約5時間で新鮮凍結および4%パラホルムアルデヒド固定標本（4℃、48時間）を得た。固定標本から20ミクロンの浮遊切片を作製した。この症例の咽頭拭い液からA（H3N2）型インフルエンザウイルス（A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98）が分離されたので、これに対する各種抗体を用い、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、蛍光標識による免疫組織化学染色をそれぞれ行った。また、新鮮凍結標本から、Nested RT-PCRにより、ウイルス遺伝

表1 インフルエンザウイルス脳炎サーベイランス 1998年

番号	年齢	性	臨床症状	ウイルス分離 (咽頭拭い液)	ウイルス分離 (血清)	ペア 血清	ウイルス分離 (髄液)	Nested RT-PCR (HA) リンパ球	Nested RT-PCR (HA) 髄液
1	6	女	熱性痙攣	A香港	ND	ND	-	-	-
2	1	男	熱性痙攣	-	ND	ND	ND	+	+
3	1	男	熱性痙攣	-	ND	ND	ND	-	-
4	11	女	頭痛	-	ND	ND	ND	+	+
5	1	男	熱性痙攣	A香港	ND	ND	-	-	-
6	1	男	熱性痙攣	A香港	ND	ND	ND	+	-
7	11	男	Reye症候群	A香港	ND	ND	ND	-	ND
8	5	男	熱性痙攣	A香港	ND	ND	-	-	-
9	2	女	熱性痙攣	A香港	ND	ND	ND	+	-
10	2	女	DOA脳炎?	A香港	ND	ND	-	-	ND
11	1	男	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	-	ND
12	3	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	-	ND
13	1	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	-	ND
14	3	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	+	ND
15	1	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	-	ND
16	8	男	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	+	ND
17	1	男	熱性痙攣	-	ND	ND	ND	-	ND
18	6	男	肺炎	A香港	ND	ND	ND	-	ND
19	9	女	急性咽頭炎	A香港	ND	ND	ND	+	ND
20	2	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	-	ND
21	3	女	熱性痙攣	-	-	-	ND	+	ND
22	1	女	熱性痙攣	-	-	- b)	ND	-	ND
23	4	男	熱性痙攣	-	-	- b)	ND	+	ND
24	3	女	熱性痙攣	A香港	-	A香港	ND	+	ND
25	1	男	熱性痙攣	A香港	ND	ND	ND	+	ND
26	1	女	熱性痙攣	A香港	ND	ND	ND	-	ND
27	10M	女	脳症	A香港	ND	A香港	ND	+	ND
28	5	男	Reye症候群	A香港	ND	ND	ND	-	ND

ND：実施していない

*：剖検例

a) 3週間目のHI；H1N1: 128倍、H3N2: 16384倍

b) 急性期血清においても抗H3N2抗体は上昇していた。

子を検索した。

RT (Takara RNA PCR kit)
10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs
2 μM Primer H3F-7 (5'ACTATCATTTGCTTTGAGC3')
0.25 μg total RNA from PBMC (by GT method),
16 ng total RNA from CSF, or
1 μg total RNA from autopsy samples
↓
95 °C, 1 min → on ice, 5 min
↓
1 U/μl RNase inhibitor
0.25 U/μl RTase
↓
42 °C, 45 min
99 °C, 5 min
5 °C, 5 min
↓
1st PCR
cDNA
10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs
0.2 μM Primer H3F-7 (5'ACTATCATTTGCTTTGAGC3')
0.2 μM Primer H3R-1184 (5'ATGGCTGCTTGAGTGCTT3')
0.025 U/μl Taq polymerase (Takara)
↓
95 °C, 5 min
↓
94 °C, 1 min
42 °C, 2 min
72 °C, 3 min x 30 cycles
↓
72 °C, 10 min
↓
4 °C
↓
Nested PCR
1st PCR 1 ml
10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs
0.2 μM Primer H3-5'n
(5'GCACACTGATAGATGCTCTATTGGG3'[18-42])
0.2 μM Primer H3-3'n
(5'GGTGCATCTGACCTCATTATTGAG3'[895-861])
0.025 U/μl Taq polymerase (Takara)
↓
95 °C, 5 min
↓
94 °C, 1 min
55 °C, 1 min
72 °C, 2 min x 30 cycles
↓
72 °C, 10 min
↓
4 °C

図2 Aホンコン型インフルエンザウイルスHA遺伝子のNested RT-PCRによる検出

C. 研究結果

1、インフルエンザウイルス脳炎脳症患者からのウイルスゲノム断片の検出

28例中21例の咽頭拭い液より、A香港型インフルエンザウイルス(H3N2)が分離同定された(表1、分離率:75%)。今期分離したH3N2ウイルスを以前に分離したウイルスと比較すると、ガチョウ赤血球では、HA価が上昇しにくかったが、モルモット赤血球を用いて測定したHA価は同等に上昇した。Nested RT-PCRの結果、11例(うち死亡1例)の末梢血単核球(PBMC)画分からインフルエンザウイルス遺伝子(H3型)を検出した(39%、検出感度は1 fgのRNA)。その中で、脳脊髄液を採取できた症例8例の中から、さらに、2例においてインフルエンザウイルス遺伝子を検出できたが、これらはいずれもリンパ球画分から検出できた症例であった。また、11例の血清、10例の髄液からのウイルス分離を行ったが、インフルエンザウイルスは分離できなかった。なお、これらの症例は、全て、ワクチンは未接種であった。

2、1998年分離株の特徴

症例7、10の咽頭拭い液より、MDCK細胞を用いて分離したウイルス(A/インフルエンザウイルス/長崎/76/98、A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98)のHA、NP遺伝子の塩基配列を、1995年の流行時に分離したウイルス(A/インフルエンザウイルス/長崎/48/95、A/インフルエンザウイルス/長崎/97/95)、A/Udom/72、A/Aichi/2/68と比較した。HAでは特にH1部分のみを比較しても、プライマリーレセプター結合部位、2次レセプター結合部位、抗原決定基に変異が見られた(図3)。A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98は抗A/Kumamoto/22/76(H3N2)抗体、抗A/PR/8/34(H1N1)抗体には反応が弱く、抗A/Memphis/1/96(H3N2)抗体によく反応したが、これらの変異点は、その反応性と一致する。

また、A/インフルエンザウイルス/長崎

176/98、A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98のNPは、HLA B27拘束性CTLエピトープに相当するアミノ酸383～391の2番目のアンカーのアミノ酸がR→Gに変異していた(図4)。



図3 1995年及び、1998年分離株 (H3N2) のHA1上の変異点

A/インフルエンザウイルス/長崎/48/95、A/インフルエンザウイルス/長崎/97/95、A/インフルエンザウイルス/長崎/76/98、A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98のHA1の変異点をA/Aichi/2/68のHA1 (PDB entry: 1HGG) 上にプロットした。(グラフィックは大正製薬創薬研・小田晃司による)

3、剖検

この症例(症例10)の咽頭拭い液からはA (H3N2) 型インフルエンザウイルス (A/インフルエンザウイルス/長崎/97/95) が検出された(表1)。しかし、受診時のPBMCからは、Nested RT-PCRにてインフ

ルエンザウイルス遺伝子 (H3型) は検出されなかったし、受診時の脳脊髄液からはインフルエンザウイルスは分離できなかった。

	383	391
A/Nagasaki/76/98	SGYWAIRTR	
A/Nagasaki/93/98	SGYWAIRTR	
A/Nagasaki/48/95	SRYWAIRTR	
A/Nagasaki/97/95	SRYWAIRTR	
A/Udorn/72	SRYWAIRTR	

図4 NPのHLA B27拘束性CTLエピトープの相異

A/インフルエンザウイルス/長崎/48/95、A/インフルエンザウイルス/長崎/97/95、A/インフルエンザウイルス/長崎/76/98、A/インフルエンザウイルス/長崎/93/98、A/Udorn/72のNPのHLA B27拘束性CTLエピトープに相当するアミノ酸383～391を示した。

各種陰性対照との比較から、インフルエンザウイルスA/Kumamoto/22/76 (H3N2) に対するニワトリ抗血清でのウイルス陽性部位は、肺、肝臓、心筋、脳(小脳、脳幹部)であった。腎臓、脾臓、膵臓、筋肉、および脳(海馬、側頭葉、前頭葉、後頭葉、頭頂葉)には、特異的染色はなかった。胚胞及び血管内遺残血球のうち、リンパ球の一部が抗体で染色された(図5)。

Nested RT-PCRにて、剖検時の髄液、脳(前頭葉、側頭葉、海馬、小脳)、肺、腎臓、肝臓から、インフルエンザウイルス遺伝子 (H3型) が検出された。

D.考察

咽頭拭い液からは75%の分離率でA香港型インフルエンザウイルス(H3N2)が分離同定されたにもかかわらず、ほとんどの症例では末梢血リンパ球、髄液、血清からはウイルスゲノムの検出、ウイルスの分離はで

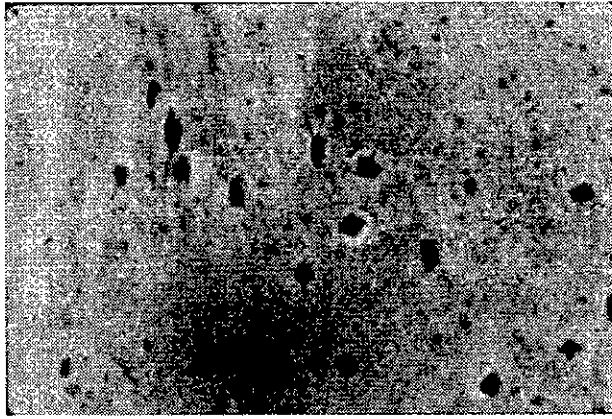


図5 剖検脳におけるインフルエンザウイルス（H3N2）抗原の検出

下オリブ核の神経細胞が抗インフルエンザウイルスA/Kumamoto/22/76（H3N2）抗体により黒く染色されている。

きなかったことから、外来受診時において、これらの臓器では、まだ、検出感度内に入るほどウイルスの増殖はおこっていなかったことが考えられる。これは、脳炎・脳症の症状が出ているときでも末梢血リンパ球、髄液中にはウイルスは十分増殖していないことを意味している。

また、1998年1月～3月に分離したウイルスはこれまでに分離したH3N2ウイルスと比較すると、ガチョウ赤血球に対する赤血球凝集反応が悪く、モルモット赤血球に対しての赤血球凝集反応はこれまでに分離されたウイルスと同程度におこった。このことから、HAのレセプター結合部位に変異があることが予想されるので、塩基配列決定による変異箇所の決定を行ったところ、やはり予想通り、レセプター結合部位と抗原決定基に変異が存在した（図3）。

また、重症例（症例7、10）から分離したウイルス（A/Nagasaki/76/98、A/Nagasaki/93/98）はNPのHLA B27拘束性のCTLエピトープに変異があった（図4）。

剖検症例の脳内の病理変化は、明らかな炎症性細胞浸潤を欠き、脳幹部の広範な神経細胞中にインフルエンザウイルス抗原を

認められた。小脳では、プルキンエ細胞の一部が明瞭に染色された。後頭蓋窩における強い変化は、これまでの画像所見の報告での、視床から脳幹部に至る病巣に対応するものと考えられた。肺、肝臓、心筋病変は、肺炎、ショック（横紋筋融解を示す検査所見を伴う）、DICと関連すると考えられた。ウイルス抗原陽性であるリンパ球の一部はウイルス血症の可能性を示すものと考えられた。

E. 結論

1、脳炎・脳症を疑わせる症例28例（内死亡例1）中11例からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された(39%)（表1）。その中で、脳脊髄液を採取できた症例8例の中から、さらに、2例においてインフルエンザウイルス遺伝子を検出できたが、これはいずれもリンパ球画分からも検出できた症例であった。

2、PBMC、髄液からのインフルエンザウイルスゲノムの検出と、患者の重症度とは関係がなかった。

3、HAの構造もレセプター結合部位、及び抗原決定基の変化以外特に問題となりそうなところはなかったが、重症患者から分離したインフルエンザウイルスはNPタンパクのHLA B27拘束性のCTLエピトープに変異があった。したがって、HLAとインフルエンザウイルス感染との関連について今後、明らかにされなければならない。

4、今回調べた患者は総て、予防接種を受けていなかった。

5、死亡例を剖検し、脳（脳幹部、小脳）の神経細胞をはじめ、肺、肝臓、心筋にウイルス抗原を同定した。しかも、脳脊髄液を含め、調べた総ての臓器（大脳、小脳、肺、腎臓、肝臓）からNested-RT PCRにてウイルス遺伝子が検出された。従って、こ

の症例は、剖検時にはウイルス血症により、全身感染をおこしていたことは間違いない。この患者は、来院時すでに心停止していたが、そのときの末梢血リンパ球（PBMC）画分からはウイルス遺伝子は検出できていないし、脳脊髄液からはウイルスは分離されなかったため、その時に脳にまでウイルス感染が及んでいたかどうかは不明である。つまり、インフルエンザウイルスによる脳炎・脳症は直接ウイルスが増殖したことによるものか、あるいは、それ以外の2次的な要因によるものかは今後明らかにされなければならない。

F.研究発表

1、論文発表

1. Shoji Kaminaka, Yoshihiro Imamura, Masahisa Shingu, Teizo Kitagawa and Tetsuya Toyoda. Studies of Bovine Enterovirus Structure by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. J. Virol. Methods、印刷中

2. Kenji Masunaga, Kiyohisa Mizumoto, Hirohisa Kato, Akira Ishihama and Tetsuya Toyoda. Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies. Virology、印刷中

2、学会発表

1、豊田哲也、今村宜寛、七種啓行、中下誠郎、出口雅経、上田竜生、野口英太郎、長崎県において今期流行したインフルエンザウイルス脳炎患者からのウイルスの分離と遺伝子の同定（第46回日本ウイルス学会学術集会、東京、1998年）

2、高橋美津雄、山田達夫、中下誠郎、七種啓行、出口雅経、野口英太郎、上田竜生、喜田 宏、豊田哲也、インフルエンザ脳症が疑われた剖検例の病理学的検討（第46回日本ウイルス学会学術集会、東京、1998年）

3、大津 寧、豊田哲也、インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのサブユニット結合に重要なアミノ酸の同定（第46回日本ウイルス学会学術集会、東京、1998年）

4、升永憲治、水本清久、豊田哲也、抗ペプチド抗体を用いたインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのCap依存性RNase活性部位の同定（第46回日本ウイルス学会学術集会、東京、1998年）

G.知的所有権の取得状況

なし

別添4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (1)

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Studies of Bovine Enterovirus Structure by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy.	1999 印刷中	J. Virol. Methods	Shoji Kaminaka, Yoshihiro Imamura, Masahisa Shingu, Teizo Kitagawa and Tetsuya Toyoda
Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies.	1999 印刷中	Virology	Kenji Masunaga, Kiyohisa Mizumoto, Hirohisa Kato, Akira Ishihama and Tetsuya Toyoda
Slow evolutionary rate of GB virus C/Hepatitis G virus, J. Mol. Evol.	1999(in press)	Mol. Evol.	Suzuki, Y., K. Katayama, S. Fukushi, T. Kageyama, A. Ohtani, H. Okamoto, Y. Tanaka, M. Mizokami and T. Gojobori
African origin of GB virus C/hepatitis G virus, FEBS Lett., 423, 2, Pp. 143-148	1998		Tanaka, Y., M. Mizokami, E. Orito, K.-i. Ohba, T. Kato, Y. Kondo, I. Mboudjeka, L. Zekeng, L. Kaptue, B. Rikandou, P. M'Pele, J. Takehisa, M. Hayami, Y. Suzuki and T. Gojobori
Intragenic recombinations in rotaviruses, FEBS Letters, 427, 2, Pp. 183-187	1998		Suzuki, Y., T. Gojobori and O.Nakagomi
The origin and evolution of human T-Cell lymphotropic virus type I and II, Virus Genes, 16, 1, Pp. 69-84	1998		Suzuki, Y. and T. Gojobori
Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus, Virology, 249, 2, Pp. 440-452	1998		Horiuchi, M., Y. Yamaguchi, T. Gojobori, M. Mochizuki, H. Nagasawa, Y. Toyoda, N. Ishiguro and M. Shinagawa

別添4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (2)

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization, Arch. Virol., 143, 12, Pp. 2493-2503	1998	Arch. Virol.	Robertson, B., G. Myers, C. Howard, T. Brettin, J. Bukh, B. Gaschen, T. Gojobori, G. Maertens, M. Mizokami, O. Nainan, S. Netesov, K. Nishioka, T. Shin-i, P. Simmonds, D. Smith, L. Stuyver and A. Weiner
Innovations in Preventive Vaccination. Asian Medical Journal 41(3);148-152,	1998	Asian Medical Journal 41	Harumi Kuno-Sakai
噴霧接種インフルエンザワクチン 臨床とウイルス 27(2),	1999 印刷中	臨床とウイルス	堺 春美
Determinants of pantropism of the FI-R mutant of Sendai virus: specific mutations involved are in the F and M genes, Arch. Virol.143(12); 2343-2352,	1998	Arch. Virol.	H.Okada,J.T.Seto,N.L.Mcqueen, H.-D.Klenk,R.Rott andM.Tashiro
感染症に対するDNAワクチンの開発、Pharma Medica 16(2), 77-82	1998	Pharma Medica	板村繁之、田代真人
インフルエンザウイルスの生態学とサーベイランス体制、日本医師会雑誌、120(7),1030-1033	1998	日本医師会雑誌	田代真人
口腔咽頭細菌のプロテアーゼとインフルエンザウイルスの活性化、日本医師会雑誌、120(7),1029	1998	日本医師会雑誌	田代真人

別添4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (3)

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
インフルエンザはなぜ、今、問題となるか：新型出現のメカニズム、医薬ジャーナル、34(9),109-116,	1998	医薬ジャーナル	田代真人
新型インフルエンザの大流行にそなえて：ワクチン開発・製造・問題点、臨床と研究,75(12),2534-2537	1998	臨床と研究	田代真人
インフルエンザワクチン開発の現状と問題点、治療学,32(12),1492-1496	1998	治療学	田代真人
香港におけるH5N1型インフルエンザの流行、ウイルス,48(2),211-221	1998	ウイルス	田代真人
インフルエンザをめぐるトピックス,Pharma Medica 16(11),91-99	1998	Pharma Medica	木戸博、田代真人
A型インフルエンザウイルスの分離と命名、日本医事新報,3896,108-109	1998	日本医事新報	田代真人