

厚生省

平成11年度

平成11年度厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

インフルエンザ大流行に備えた
危機管理対策の確立に関する研究

平成12年3月

主任研究者 田代眞人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

厚生省
平成11年度

平成11年度厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

インフルエンザ大流行に備えた
危機管理対策の確立に関する研究

平成12年3月

主任研究者 田代眞人
(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

インフルエンザ大流行に備えた危機管理対策の確立に関する研究

平成11年度 研究組織

主任研究者

田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部 部長

分担研究者

喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

中島 捷久 名古屋市立大学医学部ウイルス学 教授

中村喜代人 山形大学医学部細菌学 教授

鈴木 康夫 静岡県立大学薬学部 教授

小田切孝人 金沢医科大学微生物学 助教授

中島 節子 国立公衆衛生院衛生微生物学部分子疫学室 室長

黒田 和道 大阪薬科大学 助教授

水田 克巳 山形県衛生研究所 医学研究専門員

菅谷 憲夫 日本鋼管病院 小児科長

協力研究者

永田 恭介 東京工業大学

目 次

1. インフルエンザ大流行に備えた危機管理対策の確立に関する研究 1頁
総括研究報告書（平成11年度）
主任研究者：田代真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部長）
2. 新型ウイルスのヘマグルチニン亜型の予知と流行防止のための疫学調査 7頁
分担研究者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）
共同研究者：岡崎克則、高田礼人（北海道大学大学院獣医学研究科）
3. インフルエンザウイルスNPペプチドを用いた粘膜ワクチンの開発 9頁
分担研究者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）
共同研究者：小笠原一誠（滋賀医科大学医学部）、
岡崎克則、高田礼人（北海道大学大学院獣医学研究科）
4. 名古屋国際空港における帰国者からのインフルエンザウイルスの分離に関する研究 11頁
分担研究者：中島捷久（名古屋市立大学医学部ウイルス学講座教授）
5. アジア型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白の抗原構造に関する研究 13頁
分担研究者：中村喜代人（山形大学医学部教授）
6. インフルエンザウイルスの宿主域変異機構に関する研究 16頁
分担研究者：鈴木康夫（静岡県立大学薬学部生化学）
7. インフルエンザBウイルスBM2蛋白の機能解析 18頁
分担研究者：小田切孝人（金沢医科大学医学部助教授）
8. アジアかぜA(H2N2)インフルエンザウイルスの分子進化に関する研究 22頁
分担研究者：中島節子（国立公衆衛生院衛生微生物学部分子疫学室長）
9. 抗インフルエンザウイルスCTLのウイルス増殖抑制活性に関する研究 25頁
分担研究者：黒田和道（大阪薬科大学助教授）
10. 仙台市におけるインフルエンザA香港型のHA1アミノ酸変異多発領域の解析 28頁
分担研究者：水田克巳（山形県衛生研究所微生物部）
協力研究者：永井幸夫（永井小児科医院）、岡本道子（国立仙台病院ウイルスセンター）
鈴木宏（新潟大学医学部公衆衛生学）、
宮本勉（医療法人掬水会老健施設エバグリーン名取）、
中村喜代人（山形大学医学部細菌学教室）
11. インフルエンザウイルスの感染症の迅速診断、FLU OIAの検討 34頁
分担研究者：菅谷憲夫（日本鋼管病院小児科長）
12. インターフェロン誘導性Mxタンパク質を利用したインフルエンザウイルス制御法の開発 38頁
協力研究者：永田恭介（東京工業大学大学院生命理工学研究科）
13. インフルエンザ大流行に備えた危機管理対策の確立に関する研究 42頁
総合研究報告書
主任研究者：田代真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部長）

インフルエンザ大流行に備えた危機管理対策の確立に関する研究

主任研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

研究要旨 ハイリスク群に重症化と死亡をもたらすインフルエンザは高齢化社会において重要度の高い感染症である。特に新型ウイルスによる世界的な大流行の際には、地球生活環境の変化等により短期間に甚大な健康被害と社会的混乱をもたらす、未曾有の大被害が起こることが予想されるので、国家レベル、地球レベルでの危機管理対策が必要となる。本研究は、高齢者社会に向けた総合的インフルエンザ対策の中で、特にインフルエンザ大流行に備えた危機管理体制の早急な構築と対応計画の整備を目的として、①流行規模、被害状況、社会的影響等の予測とシミュレーションおよび各状況に置けるシナリオの作製、②各シナリオにおける被害の最小化を図るための準備と対応及び社会危機への対応策の策定、③大流行出現に関与するウイルス側要因及び生体側要因の解明と大流行予測方法の確立、の3点から調査研究および基礎研究を行った。

分担研究者

喜田宏（北海道大学大学院獣医学研究科教授）
中島捷久（名古屋市立大学医学部ウイルス学教授）
中村喜代人（山形大学医学部細菌学教授）
鈴木康夫（静岡県立大学薬学部長）
小田切孝人（金沢医科大学微生物学助教授）
中島節子（国立公衆衛生院微生物学部分子疫学室長）
黒田和道（大阪薬科大学第2微生物学助教授）
水田克巳（山形県衛生研究所微生物部ウイルス室長）
菅谷憲夫（日本鋼管病院小児科部長）

研究協力者

永田恭介（東京工業大学生命工学部助教授）

A. 研究目的

ハイリスク群に重症化と死亡をもたらすインフルエンザは高齢化社会において重要度の高い感染症である。特に新型ウイルスによる世界的な大流行の際には、地球生活環境の変化等により短期間に甚大な健康被害と社会的混乱をもたらす、未曾有の大被害が起こることが予想されるので、国家レベル、地球レベルでの危機管理対策が必要となる。本研究は、高齢者社会に向けた総合的インフルエンザ対策の中で、

特にインフルエンザ大流行に備えた危機管理体制の早急な構築と対応計画の整備を目的とした。

B. 研究方法

①流行規模、被害状況、社会的影響等の予測とシミュレーションおよび各状況に置けるシナリオの作製、
②各シナリオにおける被害の最小化を図るための準備と対応及び社会危機への対応策の策定、
③大流行出現に関与するウイルス側要因及び生体側要因の解明と大流行予測方法の確立、の3点から調査研究および基礎研究を行った。

C. 研究結果

(1) 情報の収集と解析体制の検討：新型ウイルス早期発見と大流行の可能性の解析評価体制確立のために、サーベイランス情報の集中収集方法、超過死亡算出及び血清疫学・分子疫学的解析法の確立について、また諸外国のインフルエンザ対策を検討した。
(2) 香港H5N1型インフルエンザへの対応：香港での流行に際し、情報の収集・解析・還元、診断上の技術支援、ワクチン開発等の国内対応と国際協力を行った。
(3) 大流行時の流行規模・被害の算定予測：新型

ウイルス出現と大流行を想定したシナリオを作製して、流行規模、健康被害、社会・経済への影響等を検討し、各シナリオ毎の大流行の被害・影響及びその可能性を検討した。

(4) 被害を最小に留める為の準備と対応の検討：大流行被害を最小の抑えるために、ワクチン及び抗ウイルス剤の有用性を検討した。更に、ワクチン政策を含めた有効で実行可能な準備体制と対応体制及び健康危機管理・社会危機管理政策を検討した。

(5) 新型ウイルス出現と大流行の機序と流行予測法：新型ウイルス出現と流行に関する科学的予測、有効なワクチンの設計、抗ウイルス剤の開発を目的として、ウイルスの生態、増殖機構、変異機構及び流行要因を分子遺伝学、免疫学から検討した。

その結果、①流行規模、被害状況、社会的影響等の予測とシュミレーション、②被害の最小化を図るための準備と対応及び社会危機への対応策の策定に関する成果は、新型インフルエンザ検討会、インフルエンザ特定感染症予防指針策定会議での検討に活用され、その結果、基本方針である「報告書」「指針」としてまとめられた。

更に、平成9年に香港で発生したH5N1型インフルエンザにおける具体的な行政対応に活用された。また、①、②については、基本方針に基づいて、具体的な行動計画を策定する作業を継続する必要がある。またWHOが発表した新型インフルエンザ対策大綱に合わせて、我が国の準備・対策の基本方針の再検討と行動計画案の策定作業が必要である。

③大流行出現に関与するウイルス側要因及び生体側要因の解明と大流行予測方法の確立については更に検討が必要である。

また分担研究者および研究協力者による研究結果について概説する。

1) 新型ウイルスのHA亜型の予知と流行予測については、シベリアの水禽営巣地におけるウイルス採取とその亜型、抗原解析および遺伝子解析を行い、ウイルスの分布を明らかにすることが出来た。これらは新型ウイルスに対するワクチン開発用の候補株として利用することが期待できる。また中国南部のブタ血清について抗体調査を実施し、H9N2型ウイルスが既にブタの間で広く伝播していることが明らかにされた。北海道および香港で野鳥および家禽から分離されたH9N2型ウイルスのNS内部遺伝子はいずれもAアリルに属していたことから、新型ウイルスの候補としてH9ウイルスの注目すべきであると考えられた。

2) 自然界でブタがカモとヒトのウイルスの交雑の場となっていることを分子レベルで解析した結果、ウイルス受容体であるシアル酸分子種に対する変異に必須なHA分子内のアミノ酸を同定した。ヒト型ウイルスとトリ／ブタ型ウイルス間の変異が、ただ1つのアミノ酸置換で起こることを実験的に証明した。これらの結果は、自然界でインフルエンザウイルスがトリからブタへ、更にブタからヒトへ伝播する機構を解明する上で極めて重要な手掛かりを与えているものである。

3) 仙台市において分離されたA香港型インフルエンザウイルスのHA蛋白上の抗原変異多発領域の詳細な比較解析を行った結果、流行の主流となる変異株が、少数ながら既に4～5年前から出現しており、小規模の伝播をしていることが示唆された。これは、抗原変異株の早期検知と流行予測という両面から、今後のサーベイランスのあり方に再検討を迫るものであり、引き続き観察を続ける必要がある。

4) 名古屋国際空港における海外からの入帰国者から分離されたウイルスの解析を行ったところ、国内の流行とほぼ一致するウイルスが分離されていた。更に国内での流行に先駆けて分離されていたものもあり、海外からのウイルスの流入を早期に検知するための方法として有用であろう。

5) アジアカゼウイルス(H2N2型)の分子進化を解析した結果、様々な時期に世界各地で分離されたウイルスは、時間的に同一であり、特定の変異ウイルスが一斉に世界中に伝播されていたことが示唆された。さらに、流行の主流となったウイルスは必ずしも年代的に連続しておらず、複雑な分岐を繰り返しながら選択されていることが明らかとなった。流行ウイルスの予測について、更に詳細な検討が必要である。

6) H1N1スペインカゼ型が40年、H3N2型香港型が既に30年、H1N1ソ連型が20年間に亘って流行を繰り返しているのに対して、H2N2型アジア型インフルエンザは10年で消失した。この理由をHA蛋白上の糖鎖構造の面から解析したところ、糖鎖がHA蛋白の抗原決定部位を立体的に被覆してしまい、免疫の攻撃から防御していることが明らかになった。H2型のHAでは、糖鎖結合部位の数が少なく、糖鎖の付加による抗原決定基の修飾の影響を受けにくいために、免疫からの逃避能力に限界があり、10年間という比較的短期間に駆逐されてしまったものと考えられる。これに対して、H3やH1型では、糖鎖結合部位の数が多いために、抗原決定部位が被覆されて免疫による攻撃から逃避

出来、長期間に亘って連続抗原変異を続けることが可能になったものと考えられる。この方面からの解析によって、新型ウイルス出現とは独立に、旧亜型のウイルスが消失して不連続抗原変異が生じる時期を推定できる可能性がある。

7) B型インフルエンザは新型インフルエンザとしては問題とならないが、大流行間期における健康被害としては、A型と並んで重要である。しかし、B型ウイルスに関しては、構造および機能上からA型との違いは明確ではなく、インフルエンザ対策上からもその解明が必要である。これらの解析を進めたところ、A型ウイルスのM2に相当すると考えられるBM2を見出し、それが感染細胞内でヌクレオカプシド複合体と結合して、ヌクレオカプシドの細胞質内輸送およびウイルス粒子への取り込み、粒子形成に関与する蛋白であることが明らかになった。この過程を標的とした抗ウイルス剤の開発が期待される。

8) インターフェロンによって誘起される抗ウイルス機構のうちで、特にインフルエンザウイルスに特異性の高いMx蛋白を利用したウイルス制御方法の開発を目的として、ヒトMx A発現細胞を用いて作用機序を分子レベルで解析した。その結果、ヒトMx A蛋白発現細胞では、蛋白質合成とウイルス増殖の抑制および細胞死の亢進が認められた。またMx Aによるウイルス増殖抑制機能の発現には、ウイルス種や株特異性が存在することが明らかとなった。

9) インフルエンザの感染・発症阻止に重要と考えられる細胞障害性T細胞のウイルス増殖抑制効果を検討した結果、この効果は感染後期過程に働くことを見出し、更に活性が高ければ、亜型を超えて広く感染防御効果を発揮できる可能性が示された。

10) インフルエンザウイルスの新らしい迅速診断キットについて、A型およびB型ウイルスに対する感度と特異性を検討した結果、A型ウイルスに対する検出感度が若干高いことが明らかになった。抗ウイルス剤の導入に際して、これらの診断キットは有用である。

D. 考察

1) インフルエンザの定義

感染症新法に基づいて、インフルエンザに対する報告のためのcase definitionが初めて規定された。インフルエンザはA型またはB型インフルエンザウイルスの感染による流行性の急性呼吸器感染症である。その臨床像は、上気道炎症状

に加えて、突然の高熱と全身倦怠感、頭痛、筋肉痛、関節痛等の全身症状を特徴とし、数日の臥床を強いられる様な重症感を伴う。流行期（我が国では例年11月から3月頃）にこれらの症状があった場合にはインフルエンザが強く疑われるが、非流行期での臨床診断は困難である。新感染症法では第4類に分類され、国が感染症発生動向調査（サーベイランス）を行い、その結果等に基づいて必要な情報を一般国民や医療機関関係者に提供・公開していくことによって、発生・拡大を防止すべき感染症とされている。医師から都道府県知事等への届け出のための診断基準では、1) 症状や所見からインフルエンザが疑われ、かつ(1) 突然の発熱、(2) 38℃を超える発熱、(3) 上気道炎症状、(4) 全身倦怠感等の全身症状の4基準をすべて満たすもの、あるいは、2) 上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状や所見からインフルエンザが疑われ、かつ病原体診断や血清学的診断によってインフルエンザと診断されたものとなっている。この診断基準はあくまでも行政上の報告のために割り切ったものであり、個々の症例については医師が知識と経験に基づいて判断することとなる。

2) インフルエンザの危険性と問題点

インフルエンザは毎年冬季に流行を繰り返し、短期間に集中して数百万人規模で多数の患者が発生する。更に65歳以上の高齢者、乳幼児、妊婦や様々な基礎疾患を持つハイリスク群がインフルエンザに罹患すると、肺炎の合併や入院、死亡の危険が健康成人に比べて数100倍も高くなる。従ってインフルエンザは、かぜ症候群と総称される急性呼吸器感染症とは区別されて、患者の健康被害の大きさと、その流行規模から社会・経済的にも大きな影響をもたらす重要な疾患として認識されている。特に高齢化社会に向かって、高齢者施設における死亡多発事例が大きな社会問題となっている。また幼小児における脳炎・脳症の発生も問題となっており、その解決が強く望まれている。

更にA型インフルエンザでは、数十年に一度の割合で新型ウイルスがヒトの世界に登場して全世界を席卷する大流行を起こす。その結果、地球レベルでの甚大な健康被害と大きな社会的混乱がもたらされ、歴史を変えるような事態が起こる。近年における人口及び人口密度の増加、交通の発達、人の行動の質量ともにおける増加など、地球上での生活様式・生活環境の大きな変化に伴って、次に大流行が起こった際には未曾有の健康被害と大混乱が生じる可能性

が危惧されている。1997年の香港におけるH5N1型トリインフルエンザウイルスの出現は、これに対する重大な警告であった。この様な事態に対して、WHOをはじめ各国では対策準備を進めており、国際協力下でのインフルエンザ危機管理体制の確立が緊急課題である。

3) 高齢者のインフルエンザ

インフルエンザが高齢者にとって「命の灯火を吹き消す」危険な疾患であり、高齢者が第1のワクチン接種対象者であることは欧米では周知の事実である。日本でもインフルエンザの流行期・流行規模に一致した超過死亡の突出と65歳における平均余命の急落が証明されているが、最近まで高齢者のインフルエンザは大きな問題として取り上げられなかった。しかし数年前から、特別養護老人ホームや老人保健施設等でのインフルエンザの流行や死亡を含む健康被害が報道されて注目を集めている。この理由として、1) 社会の高齢化が進み高齢者人口が増加した2) 介護福祉の普及に伴い高齢者が施設内で集団生活する機会が増加した、3) 高齢者は様々な基礎疾患を持ち、インフルエンザにおける二重のハイリスク群となっている、4) 施設内の生活・衛生環境が必ずしも適切でないために施設内感染が起りやすく、また流行時の介護や医療体制が十分に対応出来ない、5) 高齢者では臨床症状が強く出ないので手遅れになりやすい、6) 高齢者に対するワクチン接種が普及していない、などが指摘できる。現在人口の6人に1人は高齢者であり、高齢者におけるインフルエンザは今後ますます大きな問題となる。

4) 小児のインフルエンザ脳炎・脳症

インフルエンザ流行期に一致して、小児における脳炎・脳症の報告が数年前から増えている。発熱後1～2日に急激な経過で意識障害や痙攣・麻痺などの中枢神経症状を呈し、患者の約1/3は3～4日以内に死亡、1/3は後遺症を残す予後の悪い疾患である。厚生省による実態調査などからは、1シーズンに全国で500～1000名の患者発生、死亡者150～250名と推測されている。従来もインフルエンザに関連した小児の脳炎・脳症の報告は散見されていたが、この疾患が以前から存在したもののなのか、最近増加傾向にあるのかは不明である。患者の多くは1～5歳の幼児であるが、臨床像や病態には幅があり、現時点ではライ症候群、出血性ショック／脳症症候群、急性壊死性脳症を含む広義の症候群として捉えておくのが現実的であろう。一方、外

国ではこの様な症例はライ症候群に一括されており、アスピリン投与を中止してからはほとんど発生していないと報告されている。しかし我が国ではアスピリン服用歴や血中アンモニア上昇が見られない症例が多く、ライ症候群とは明らかに区別される疾患が主体を占めている。ウイルスが脳内に侵入して感染したことが明らかな症例は稀であり、感染から発症までの経過が短いことや血中サイトカイン濃度の極端な変動例が多いことなどから、呼吸器におけるウイルス感染に基づくサイトカイン・ネットワークの異常反応の関与が強く示唆されている。発症における特別なウイルス株の関与、患者側の特殊な条件、投与薬剤の関与、ワクチン接種による発症防御の可能性等については全く不明であり、病因・病態の早急な解明と治療法・予防法の開発が期待される。

5) インフルエンザ対策の新展開

1994年の予防接種法改正でインフルエンザワクチンは予防接種法の対象からはずされて学童・生徒に対する集団接種が中止されたが、現行ワクチンは個人防衛には有効なので任意接種は推進するとの方針が示されている。しかしこの経緯が一般には正確に伝わっておらず、「国が強制接種を中止したのはワクチンの有効性が否定されたからだ。」との誤解を生じ、ワクチン不信感が増幅されてワクチン摂取率は1%未満を低迷してきた。その結果ワクチン生産量は激減して、新型インフルエンザ出現時の緊急増産にも対応困難な状態になった。更にインフルエンザ治療薬としてのアマンタジンは承認されておらず、インフルエンザ対策は崩壊状態に陥った。

厚生省はインフルエンザを健康危機管理上の重要問題をして、1997年に検討会を組織した。同年末の香港におけるH5N1型ウイルス出現の際には、新型インフルエンザは危機管理上の大問題としてマスメディアでも広く議論された。一方、同時期から高齢者施設における健康被害が強い社会的関心を呼び、厚生省では高齢者へのワクチン接種を積極的に推奨するようになった。この様な状況を踏まえて、1997年の新型インフルエンザ検討会報告書では、「新型インフルエンザ対策は通常のインフルエンザ対策の延長上にある」との基本的考え方を明確にして、インフルエンザ政策全体の再構築のための指針を提言した。その後これを具体化する努力が重ねられ、昨年から今年にかけてインフルエンザ対策にいくつかの新たな進展があった。

1. サーベイランスの強化と情報の活用

従来のインフルエンザのサーベイランスは小児科

が中心で、高齢者における実態は不明であった。新感染症法では小児科定点を3000カ所に増加するとともに、成人のインフルエンザを対象として2000カ所の内科定点医療機関を新設し、高齢者における流行動向の把握が図られている。これらの情報を効率よく収集・解析・還元するために国立感染症研究所に感染症情報センターが設置された。

更に昨年度からは、トリやブタにおけるインフルエンザ流行状況を把握してヒトへの侵入を予測・監視するとともに、新型ウイルス出現の際のウイルス診断体制の速やかな確立と緊急ワクチン開発・増産に備える目的で、これらの動物インフルエンザウイルスを分離・解析し、直ちに使用できる状態で保存しておくウイルス株系統保存事業が開始された。

2. ワクチン政策の見直し

高齢者のインフルエンザ健康被害を最小限に留めるには、本人・家族・関係者に高齢者におけるインフルエンザの特徴と危険性を周知させ、生活環境や医療体制の整備・改善を図るとともに、ワクチン接種を普及させることが必要である。最近厚生省研究班から高齢者に対するワクチンの安全性と有効性を示す成績が報告された。外国における成績とともに、高齢者に対するワクチン接種推進政策に根拠を与えるものとして評価される。高齢者へのワクチン接種は、任意ではあるが国が勧奨するとの前向きな基本方針に立って、接種費用の公費負担、副作用被害救済も含めて予防接種法の改正が予定されている。

一方、乳幼児、妊婦、基礎疾患患者等のハイリスク群については、ワクチンの安全性と効果に関する十分な成績がなく、早急な研究が必要である。また流行期には、面会制限など施設内へのインフルエンザ侵入防止や介護者・医師などの職員から入居者へのウイルス伝播の防止、また職員の罹患による介護・医療サービスの低下を防ぐことも重要である。このためには職員や家族も積極的にワクチン接種を受ける必要があろう。

3. 抗ウイルス薬の承認・導入

A型インフルエンザの予防・治療薬として開発されたアマンタジン[®]は欧米では広く使用されているが、我が国ではパーキンソン病の治療薬としてのみ承認されてきた。しかし昨年末にA型インフルエンザ治療薬としての販売承認がなされ、昨シーズンには高齢者を中心にかなり使用された。しかしアマンタジンの効果は有熱期間の短縮や症状軽減程度であり、特効薬ではない。また不眠や神経症状などの副作用もあり、耐性ウイルスも出現するので、慎重に投与すべきである。

一方最近、インフルエンザウイルスが持つレセプター破壊酵素ノイラミニダーゼ (NA) の構造解析に基づいて、基質であるシアル酸の誘導体がNAの特異的阻害剤として開発された。これらは感染細胞からのウイルス遊離を阻害して感染拡大を阻止するもので、アマンタジンと同程度の効果が認められる。A、B両型のインフルエンザ治療薬として我が国でも承認され、近く発売になる予定である。

4. 迅速診断キットの導入

抗インフルエンザ剤の使用にあたっては、不要な投薬や副作用、耐性ウイルスの出現を防ぐために、インフルエンザウイルスの感染を確認する必要がある。そこで、鼻腔・咽頭材料から数10分でウイルスの存在を診断できる簡易迅速診断キットが開発され、昨シーズンから発売されている。これらのキットの普及は、臨床診断の精度向上と、適切な抗ウイルス剤の使用による重症化防止に役立つものと期待される。今後は、これらの診断結果をどのようにサーベイランス情報に生かしていくかが課題である。

これらの施策は、人混みへの外出を控え、体力を保持し、うがいや手洗いを励行するに留まっていた従来のインフルエンザ対策からの大きな前進であろう。今後更に検討を加えて充実したものとし、インフルエンザによる健康被害の防止を推進する必要がある。

6) 新型インフルエンザ対策の進展

1997年の新型インフルエンザ検討会報告書は新型インフルエンザによる大流行対策ための指針を提言しているが、例年のインフルエンザ対策がその原点となるとされている。その上で、最悪の大流行シナリオにも対処しうることを目標にして、流行前からの十分な準備と流行時の適切な対応計画を確立するとともに、状況の変化に対応して常にこれらを更新する努力が必要である。サーベイランスによる流行動向の把握とこれに基づいた流行予測、情報の解析・交換・還元、流行予測に基づいた安全で有効なワクチンの開発・準備・大量製造と予防接種体制、抗ウイルス剤の開発・準備、迅速診断体制の確立、医療サービスの確保と維持等の健康危機管理対策に加えて、社会的な影響や混乱を未然に防止し、その被害を最小に抑える社会危機管理対策の策定と準備が必要である。現在これらの項目について具体的な行動計画を作成する作業が進んでいる。さらに、これらの実施のためには、疫学、個体、細胞、分子の各レベルにおけるインフルエンザウイルス感染過程に関する基礎研究の進展も不可欠である。

一方、この間に香港で出現したH5N1型インフルエンザは、我が国にとっても大流行対策・計画の評価・再検討のための好機であった。本年4月にWHOから新型インフルエンザ大流行対策要綱が発表されたが、これを機会に、我が国のインフルエンザ危機管理対策についても再検討し、より実効のあるものとする必要がある。

E. 結論

本研究全体として、インフルエンザ健康危機管理に対する準備と対応の確立に寄与したものと総括出来る。具体的成果としては、

- (1) 成人における感染流行動向を監視・把握するサーベイランス体制の改善・確立。
- (2) ウイルス株系統保存事業による緊急ワクチン開発・診断法開発の準備。
- (3) ハイリスク群を中心とするワクチン接種の推進と予防接種法の改正準備。
- (4) ワクチン緊急開発・増産体制の確立を含むワクチン行政の再構築。
- (4) 抗ウイルス剤と迅速簡易診断キットの導入による患者医療の向上・確保。
- (5) 新型インフルエンザに対する国際的監視機構の確立と国際協力の推進。
- (6) 情報ネットワークの充実と流行予測に基づく健康危機管理への事前対応。
- (7) 新規抗ウイルス剤や次世代ワクチンの開発によるインフルエンザ対策の進展。
- (8) インフルエンザ大流行検討委員会報告書の見直し。
- (9) WHOを中心とする新型インフルエンザ対策への提言、協力。

F. 研究発表

看護学雑誌 64(1) 77-83 インフルエンザ：前進するインフルエンザ対策/新型インフルエンザをめぐって 田代真人 2000

治療学 34(1) 5-9 インフルエンザの問題点と対策 田代真人 2000

総合臨床 49(2) 221-223 最大級の流行病インフルエンザ 田代真人 2000

新型ウイルスのヘマグルチニン亜型の予知と流行防止のための疫学調査

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

共同研究者：岡崎克則、高田礼人（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨 今後ヒトに出現する新型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン亜型を予知するため、シベリアの水禽営巣地におけるウイルスの分布を明らかにした。野鳥から分離される様々なHA亜型弱毒ウイルスは新型ウイルス出現に備えたワクチン候補株として利用することが期待される。中国南部のブタ血清について抗体調査を実施し、H9N2ウイルスがブタの間に伝播していることを示した。また、北海道および香港で野鳥および家禽から分離されたH9N2ウイルスのNS遺伝子はいずれもAアリルに属していたことから、新型ウイルス対策としてH9ウイルスを含める必要性が示唆された。

A. 研究目的

研究分担者らはインフルエンザウイルスの供給源が野生の水禽(渡りガモ)であること、1968年に出現した新型ウイルス A/ Hong Kong/ 68 (H3N2) 株はカモのウイルスが中国南部でアヒルを介してブタに感染し、同時に感染したヒトのウイルスとの間で産生された遺伝子再集合体であることを明らかにした。また、インフルエンザウイルスは渡りガモの営巣湖沼に存続し、新型ウイルスの登場舞台と想定される中国南部には、シベリアで営巣した渡りガモによって運ばれることを証明した。さらに、北海道の渡りガモから分離された弱毒 H5N4 ウイルスを精製、不活化し、マウスの鼻腔内に投与することによって、致死量の強毒 H5N1 ウイルス攻撃に対する感染防御が成立することを示した。

1997年、香港の生鳥市場で多数の強毒 H5N1 ウイルスならびに弱毒 H9N2 ウイルスが分離された。これらの H5N1 ウイルスと同年ヒトから分離されたウイルスとは極めて近縁であったことから、ヒトの H5N1 ウイルスはニワトリから直接伝播したものと考えられた。一方、1998年にはブタから H9N2 ウイルスが分離され、さらに、翌年3月、香港の女兒2名から H9N2 ウイルスが分離された。

本研究では、①今後ヒトに出現する新型ウイルスのヘマグルチニン(HA)亜型を予知してその流行を防止すること、②野鳥から分離される弱毒ウイルスをワクチン候補株として系統保存することを目的として、シベリアおよび渡りガモの飛来する日本国内、中国、韓国ならびに台湾において疫学調査を実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス分離および同定

1999年8月、ロシア共和国内サハ自治共和国レナ河流域において1,136検体の水禽糞便を採取した。同年10月、北海道稚内市において139検体を採取した。これらを発育鶏卵に接種して赤血球凝集因子を分離した。同定は標準抗血清を用いた赤血球凝集阻止(HI)試験およびノイラミニダーゼ阻止試験によった。

2) 遺伝子解析

1997年および1998年、北海道で採取した水禽糞便から分離された2株のH9N2ウイルスならびに1978～1998年に香港のアヒル、ニワトリ、ハトおよびブタから分離された10株のH9N2ウイルスを用いた。ウイルスRNAを抽出し、これを鋳型として逆転写酵素反応を行いcDNAを得た。インフルエンザAウイルスNS遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用い、ウイルスcDNAを鋳型としたdirect sequencing法によって塩基配列を決定した。

3) 系統進化解析

NS遺伝子の23～850塩基位についてGenbank登録塩基配列と比較し、Neighbor-joining法を用いて進化系統樹を作成した。

4) アジア各国における疫学調査

中国南部のブタから1977～1982年に採取された127および1998年に採取された101の血清検体についてA/duch/Hokkaido/4/96(H5N3)株ならびにA/swine/Hong Kong/9/98(H9N2)株を抗原としてHI試験および中和試験を行った。被験血清はニワトリ赤血球で吸収した後、RDE処理を施した。

韓国ソウル大学および家畜衛生試験場、中国北京農科大学、台湾省家畜衛生試験所、タイ Kasetsart 大学および国立家畜衛生研究所ならびにミャンマー国立予防衛生試験所においてインフルエンザ疫学調査の技術指導を行った。

C. 研究結果

1) 水禽糞便からのインフルエンザウイルスの分離

1999年8月、レナ河流域で採取した1,136検体の水禽糞便から5株のH3N8ウイルスを分離した。また、同年10月に稚内市で採取した139検体からは7株のインフルエンザウイルス(2H3N8、3H6N2および2H9N2)が分離された。

台湾では1999年9月以降、渡りガモの糞便から多数のニワトリ赤血球凝集ウイルスが分離されている。現在、これらのうちの代表株について輸入手続き中である。

2) シベリアおよび北海道で分離されたカモ由来インフルエンザウイルス NS 遺伝子の系統進化解析

1997および1998年に北海道でカモの糞便から分離された H9N2 ウイルス 2 株ならびに 1978～1998 年に香港のアヒル、ニワトリ、ハトおよびブタから分離された 10 株の H9N2 ウイルスを用いた。これらの NS 遺伝子の塩基配列を決定し、Genbank 登録配列とともに系統進化解析を行った。その結果、調べた 12 株の NS 遺伝子はいずれもヒトのウイルスの NS 遺伝子を含む A アリルに属していた。北海道のカモから分離された 2 株は 1978 年および 1979 年に香港のアヒルから分離されたウイルスと近縁であった。1998 年にブタから分離された 2 株は同時期に香港の家禽から分離されたウイルスと近縁で他の鳥由来ウイルスとは異なるサブグループを形成していた。

3) 中国南部におけるブタの血清疫学調査

1977～1982 年および 1998 年に中国南部で採取されたブタ血清は、いずれも H5 ウイルスに対する HI 活性を示さなかった。一方、中和試験では 1977～1982 年に採取された 127 検体中 2 検体が、1998 年に採取された 101 検体では 10 検体が陽性であった。したがって、少なくとも 1977 年から中国南部のブタの間では散発的に H5 ウイルスの感染が起こっていたものと推測される。

H9 ウイルスに対しては、1977～1982 年に採取された血清 127 検体のうち 50 検体が HI 活性を示したが、中和試験ではいずれも陰性であった。1998 年に採取された 101 検体では 80 検体が HI 陽性、54 検体が中和陽性であった。1998 年に採取された血清で初めて中和抗体が検出されたこと、また、その陽性率が 50% 以上であったことから、H9 ウイルスは 1983 年以降に中国南部のブタに侵入し、その後ブタの間で流行を繰り返しているものと考えられる。

D. 考察

1999 年、レナ河流域の水禽営巣地帯ならびに渡りガモの飛翔路下にある北海道において水禽の糞便を採取し、それらから 12 株のインフルエンザウイルスを分離した。シベリアでの調査を開始した 1995 年以降では計 60 株のウイルスが分離されている。それらの HA 亜型は、台湾での分離株を含めると H1、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H11 および H13 の 10 種であった。北海道のカモから分離された弱毒 H5 ウイルスが強毒 H5N1 ウイルス感染に対するワクチンとして有効だったことから、その他の HA 亜型ウイルスも新型ウイルス出現に備えたワクチン株として利用することが期待される。

1997 年香港で、H5N1 ウイルスに 18 名が感染し、6 名が死亡した。また、1998 年には香港のブタから H9N2 ウイルスが分離され、さらに、翌年には女児 2 名から同亜型のウイルスが分離された。そこで、中国南部のブタにおける H5 および H9 ウイルスの浸潤状況を明らかにするため抗体調査を実施した。その結果、H5 ウイルスの感染は少なくとも 1977 年から散発的に起こっていたものと考えられた。一方、H9 ウイルスは 1983 年以降に中国南部のブタに侵入し、その後ブタの間で流行を繰り返しているものと考え

られた。したがって、H9 亜型は今後ヒトに出現する新型インフルエンザウイルスとして注意すべき一つと考えられる。

そこで、北海道のカモならびに香港の家禽およびブタから分離された H9N2 ウイルスについて NS 遺伝子の系統進化解析を実施した。その結果、調べたすべての株の NS 遺伝子が A アリルに属していた。NS 遺伝子は A、B 両アリルに大別され、ヒトのウイルスは A アリルに属する。A アリルに属する NS 遺伝子を持つウイルスは、リスザル呼吸器でよく増殖することが遺伝子再集合体を用いた実験で示されている。これまでのところ、ヒトからの H9N2 ウイルスの分離は 2 例に留まっているが、ブタでの H9N2 ウイルスの流行は新型ウイルス出現の危険因子として早急に対策を講じる必要がある。

E. 結論

シベリアに営巣する水禽から様々な HA 亜型のインフルエンザウイルスが分離された。これらの弱毒ウイルスは新型ウイルス出現に備えたワクチン候補株として利用することが期待される。また、中国南部におけるブタの血清疫学調査の成績と合わせ、新型ウイルスとして H9 ウイルスを含めて対策を立てる必要性が示唆された。

F. 研究発表

1. Imai, M., Takada, A., Okazaki, K. and Kida, H. (1999) Antigenic and genetic analyses of H5 influenza viruses isolated from ducks in Asia. *Jpn. J. Vet. Res.* 46(4), 171-177.
2. Takada, A., Kuboki, N., Okazaki, K., Ninomiya, A., Tanaka, H., Ozaki, H., Hamura, S., Nishimura, H., Enami, M., Toshiro, M., Shortridge, K. F. and Kida, H. (1999) An avirulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J. Virol.* 73, 8303-8307.
3. 喜田宏 (1999) 新型ウイルスの発生メカニズムと対策. 学術月報 52, 182-187.
4. 喜田宏 (1999) 新型インフルエンザウイルスの出現メカニズムとその対策. 小児科診療 62, 340-345.
5. 喜田宏 (1999) 繰り返されるウイルスとの闘い-インフルエンザは克服できるか. 近畿化学協会 (編), 化学の未来へ pp85-102, 化学同人, 京都
6. 喜田宏 (1999) インフルエンザの動物種間伝播: 新型ウイルスの出現に果たすカモ、家禽とブタの役割. 化学療法の領域 15, 29-34.
7. Okazaki, K., Takada, A., Ito, T., Imai, M., Takakuwa, H., Hatta, M., Ozaki, H., Tanizaki, T., Nagano, T., Ninomiya, A., Demenev, V. A., Tyaptirganov, M. M., Karatayeva, T. D., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., and Kida, H. (2000) Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch. Virol.* (in press)
8. 喜田宏 (2000) インフルエンザウイルスはどこからくるのか - 出現のメカニズムと流行の予防. 細胞工学 19, 27-32.

インフルエンザウイルス NP ペプチドを用いた粘膜ワクチンの開発

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

共同研究者：小笠原一誠（滋賀医科大学医学部）

岡崎克則、高田礼人（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨 インフルエンザウイルス A/ Aichi/ 2/ 68 (H3N2) 株の核蛋白(NP)分子上の細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープを構成するペプチド NP366-374(ASNENMDAM)を多重層リポソームに包埋し、抗 CD40 抗体とともにマウス鼻腔内に3回接種したところ、肺における Aichi株の増殖を抑制した。一方、皮下接種ではウイルス増殖抑制効果は認められなかった。ワクチンを経鼻接種されたマウスの肺では CTLの活性化が認められ、病変は検出されなかった。また、本ペプチドワクチンによるウイルスの増殖抑制効果は、最終免疫後少なくとも8週間認められた。NPペプチドワクチンはヘマグルチニン垂型に依存しないことから、新型インフルエンザの出現に際して有効と考えられる。

A. 研究目的

研究分担者らは生体の抗体応答を効果的に誘導するMHCクラスII拘束性カセット理論に基づいて、安全で効果の高い合成ペプチド粘膜ワクチンを開発した。次いで、H3垂型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)分子上に保存されているエピトープのアミノ酸配列を含むペプチドワクチンを合成し、これが27年を隔てて分離されたH3垂型変異ウイルスに対する感染防御免疫を賦与できることを示した。

本研究では、すべてのインフルエンザAウイルスに共通な核蛋白(NP)分子上のMHCクラスI拘束性細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープを構成するペプチドを合成し、マウスを用いてワクチンとしての効果を検討した。

B. 研究方法

A/ Aichi/ 2/ 68 (H3N2) (Aichi) 株NPのMHCクラスI拘束性CTLエピトープを構成するペプチド NP366-374(ASNENMDAM)を合成し、多重層リポソームに包埋した。ペプチド100nmolを含むリポソームと250 μ gの抗CD40モノクローナル抗体を混合し、C57BL/6マウスの鼻腔内あるいは皮下に接種した。2週間隔で3回免疫した後、20MID₅₀(50%マウス感染価)のAichi株を鼻腔内に接種して攻撃した。5日後に肺を採材し、ウイルス分離ならびに病理組織化学的検索、TUNEL法を用いたアポトーシスの検出に供した。

C. 研究結果

1) MHCクラスI拘束性NPペプチドワクチンの接種経路と抗CD40抗体のアジュバント効果

ペプチドワクチンによる免疫効果を調べるため、最終免疫から1週間後にAichi株を経鼻接種した。その結果、ワクチン未接種群マウスの肺からは平均10^{5.3}PFU/gのウイルスが回収されたのに対し、NP366-374を含むリポソームと抗CD40抗体の混

合ワクチンを鼻腔内に接種されたマウスでは10^{3.6}PFU/gであった。一方、皮下に接種された群ではワクチン未接種群との差は認められなかった。また、NP366-374を含むリポソーム単独、リポソームと抗CD40抗体、あるいはリポソームのみを鼻腔内に接種された群のマウスからもワクチン未接種群と同量のウイルスが回収された。以上の成績から、NP366-374を含むリポソームと抗CD40抗体を同時に鼻腔内に接種することによって肺でのウイルス増殖が抑制されることが判った。

2) ワクチン効果の持続期間

NPペプチドワクチンによるウイルス増殖抑制効果の持続期間を調べるため、最終免疫の4、8、12および16週後にウイルス攻撃を行った。その結果、4および8週後に攻撃された群では、肺からの回収ウイルス量が対照群の1/100以下であった。12週以降に攻撃した場合には1/10程度であった。したがって、NP366-374を含むリポソームと抗CD40抗体を経鼻接種することによるワクチン効果は少なくとも8週間は持続するものと考えられる。

3) 病理組織化学的検索およびアポトーシスの検出

NPペプチド-リポソームと抗CD40抗体で経鼻免疫されたマウスの肺では、ウイルス攻撃後も病変は認められず、アポトーシスを起こした細胞が散見されたのみであった。また、CD8陽性細胞およびその分布と一致してパーフォリンが検出された。一方、対照マウスの肺では気管支上皮の脱落およびアポトーシスを起こした細胞が気管支上皮および肺胞上皮に多数認められた。CD8陽性細胞は認められなかった。NPペプチド-リポソームと抗CD40抗体で免疫されたマウスでは、インフルエンザウイルスに特異的なCTLが誘導されて肺でのウイルス増殖を抑制したものと考えられる。

D. 考察

インフルエンザAウイルスNP分子上のMHCクラスI拘束性CTLエピトープを構成するペプチド NP366-374を多重層リポソームに包埋し、抗CD40抗体とともにマウス鼻腔内に接種したところ、肺に

おけるインフルエンザウイルスの増殖を抑制した。同じ試製ワクチンを皮内に接種した場合にはウイルスの増殖抑制効果は認められなかった。また、ワクチン効果発現には抗CD40抗体の添加が必須であった。活性化ヘルパーT細胞表面のCD40リガンドがマクロファージ、樹状細胞などの表面に存在するCD40に結合すると、これらの抗原提示細胞は活性化してサイトカインを産生し、CTLを活性化する。ワクチン接種マウスの肺ではウイルス特異的なCTLの活性化が認められた。したがって、本研究で用いた抗CD40モノクローナル抗体は呼吸器粘膜の抗原提示細胞を活性化することによってアジュバント効果を示したものと考えられる。

NPペプチド-リポソームと抗CD40抗体を経鼻接種すると、最終免疫から少なくとも8週間は肺でのウイルス増殖を抑制することが判った。一方、従来のカセット理論に基づくMHCクラスII拘束性ペプチドワクチンによる有効期間は最終免疫から2週間程度であった。CD40はB細胞表面にも発現し、B細胞の分化増殖に関与する。したがって、抗CD40抗体はMHCクラスII拘束性ペプチドワクチンのアジュバントとしても利用できるかもしれない。

NPの抗原性はすべてのインフルエンザAウイルス間でよく保存されているため、NPペプチドワクチンはHA亜型に関わらずウイルスの増殖を抑制することが期待できる。日本人の60%以上が保有するMHCクラスI分子に結合するNPのCTLエピトープがすでに報告されている。したがって、数種類のペプチドを混合することによってヒトへの応用が可能になるかもしれない。その際には、アジュバントとしてヒト型(またはヒト化)抗CD40モノクローナル抗体あるいは膜貫通ドメインを欠損させたCD40リガンドを用いる必要がある。

E. 結論

インフルエンザAウイルスNP分子上のMHCクラスI拘束性CTLエピトープを構成するペプチドを多重層リポソームに包埋し、抗CD40抗体とともにマウス鼻腔内に3回接種したところ、肺におけるインフルエンザウイルスの増殖を抑制した。このワクチン効果は最終免疫後少なくとも8週間持続した。

F. 研究発表

1. Matsuki, N., Ogasawara, K., Takami, K., Namba, K., Takahashi, A., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K., Good, R. A. and Onoe, K. (1999) Prevention of infection of influenza virus in DQ6 mice, a human model, by a peptide vaccine prepared according to the cassette theory. *Vaccine* 17, 1161-1168.
2. Takada, A., Okazaki, K. and Kida, H. (1999) Protective effects of intranasal vaccination with plasmid encoding pseudorabies virus glycoprotein B in mice. *Jpn. J. Vet. Res.* 47, 25-33.
3. Takada, A., Kuboki, N., Okazaki, K., Ninomiya, A., Tanaka, H., Ozaki, H., Hamura, S., Nishimura, H., Enami, M., Toshiro, M., Shortridge, K. F. and Kida, H. (1999) An avirulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J. Virol.* 73, 8303-8307.
4. Ogasawara, K. (1999) Synthetic peptide vaccines effective in preventing virus infection. *Microbiol Immunol.* 43, 915-923.
5. 喜田 宏 (1999) 新型ウイルスの発生メカニズムと対策. 学術月報 52, 182-187.
6. 喜田 宏 (1999) 新型インフルエンザウイルスの出現メカニズムとその対策. 小児科診療 62, 340-345.
7. 喜田 宏 (1999) 繰り返されるウイルスとの闘い - インフルエンザは克服できるか. 近畿化学協会 (編), 化学の未来へ pp85-102, 化学同人, 京都.
8. Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y. and Onoe K. (2000) Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J Immunol.* 164, 1230-1235.
9. 喜田 宏 (2000) インフルエンザウイルスはどこからくるのか - 出現のメカニズムと流行の予防. 細胞工学 19, 27-32.
10. 喜田 宏 (2000) インフルエンザは人獣共通伝染病 - 新型ウイルス出現のメカニズムと流行予防. 総合臨床 49, 252-255.

名古屋国際空港における帰国者からのインフルエンザウイルスの分離に関する研究

(分担) 研究者 中島捷久 名古屋市立大学医学部ウイルス学講座教授

研究要旨 インフルエンザウイルスが外国からどのように日本に浸入してくるのかを検討し、新型ウイルスの本邦への侵入をいち早く同定するためのシステムづくりの一環として、名古屋国際空港に帰国した際、かぜ症状を訴えた乗客からうがい液を採取し、ウイルス分離とウイルス血球凝集素 (HA) の塩基配列を決定し、愛知県下での流行したウイルスのそれと比較した。1996年8月より1999年3月の間、504サンプルを採取し、ウイルス株30をえた。そのうち28株がH3型で残りの2株がB型であった。分離は国内での流行時期と一致していたが、流行間期においても3株が分離された。これら帰国者からのウイルスが愛知県下での流行に関与したかどうかははっきりした疫学的情報は得られていないが、塩基配列の上からは、帰国者由来と思われるウイルスが愛知県下で分離されている。

A. 研究目的

我々は日本で流行するウイルスは海外から侵入するものであることを、報告してきた (J. Infect. Dis. 142, 1980; Epidem. Infect. 106, 1991)。しかし、これらの結論は国内、または外国で分離されたウイルスの比較で得られたのであり、海外渡航者からのウイルス分離はおこなってこなかった。今回名古屋国際空港においてインフルエンザウイルスの日本への侵入状況を検討し、新型ウイルスの日本への侵入に際して、迅速に把握するシステムの検討に寄与することを目的としたインフルエンザウイルスのサーベイランスを行なった。

B. 研究方法

ウイルス：国際空港検疫所にて風邪症状の旅行者より得たうがい液をMDCK細胞でウイルスを分離した。また、愛知県下で患者より分離されたウイルスも用いた。RT-PCR：RNAの抽出にはIsogen-LS (ニッポンジーン) を用い、cDNAの作製にはTakara-EXtaqを用いた。プライマー：A(H3N2)ウイルスのHA1領域をカバーする2ペアを用いた。塩基配列の決定：PCR産物をアガロースゲルで分離抽出し、ABIのautosequencerを用いて塩基配列を決定した。進化系統樹：Mainstream-sidestream法による進化系統樹を作製した。MS法は主流の変化と側流の変化から構成され、主流の変化は以降の大部分の株に引き継がれる変化、側流の変化は株特異的な変化からなる。

C. 研究結果

1996年から1999年3月まで名古屋国際空港の検疫所で風邪症状の海外からの帰国者についてうがい液を採取した。ウイルスは-30度で空港に保存され、1週間に1回の割で回収を行なった。採取サン

プルは504でこれからMDCK細胞でウイルスの分離をおこなった。HI試験はHI, H3, B抗体を用いた。1998年からはH5抗体も用いた。30株のインフルエンザウイルスが分離され、H3型が28でB型が2株であった。1996年には12月に4株、1997年には8月に1株、1998年には2月に10株、3月に2株、5月に2株、12月に2株分離され、1999年には1月に6株、2月に1株分離された。帰国者はほとんど香港を含む東南アジアからで、多い順では香港が7人、タイが6人であった。1997年までの株はA/Aichi/46/96(A/Wuhan/359/95-like)タイプの抗原性をもっており、1998年以降はA/sydney/5/97タイプの抗原性を持っていた。この間愛知県のインフルエンザの流行から413株のH3N2が分離されており、帰国者から分離された28株と愛知県で分離され、時期的に比較対象できる38株について、HA1領域の塩基配列から推定したアミノ酸配列を比較検討した。帰国者からのウイルスと愛知地区でのウイルスのアミノ酸配列はよく似ているが、それらのうち1997/98シーズンの1株と1998/90年の2株についてはアミノ酸配列の上で愛知県で患者から分離されたウイルスと直接的な関連があった。

D. 考察

日本ではインフルエンザウイルスは海外から侵入すると考えられているが、海外からどの程度侵入するかについての研究はなされていなかった。名古屋国際空港での我々の今回の調査では3シーズンにおいて504人の風邪様疾患から30株のインフルエンザウイルス(28株H3N2; 2株B型)が分離された。分離率は6%であるが、県下での分離率は30%であった。名古屋空港においてうがい液が-30度保

管であったことは分離率の低下をうながしたかもしれない。504人はすべて日本人であり、外国人の協力はなかった。国際空港の利用者は日本人が85%、外国人が15%であった。これら504人、また分離された人はほとんど香港をふくむ東南アジアからの帰国者であった。流行間期にウイルスが分離された患者の滞在先はタイ、インド、香港であった。これら帰国者のウイルスが愛知県での流行にどのように影響したかについては、はっきりした結論は得られていない。流行間期にウイルスは分離されたが、愛知県下ではその時期にウイルスが分離されていない。インフルエンザウイルスシーズンにおいて愛知県でのウイルス分離は帰国者からの分離よりも早くおこっている。アミノ酸配列の検討では帰国者からの分離ウイルスと直接関連すると思われるウイルスも数株分離された。

1968年にH3N2ウイルスが香港で流行をはじめから15日後に貨物船の船員によって名古屋に持ち込まれたことを考えると、現在では新型ウイルスと同定される前に、日本への上陸も充分考えられるので、国際空港でのインフルエンザウイルスサーベイランスは日本でのインフルエンザウイルス流行の解析の一助であると同時に、新型ウイルス侵攻の早期発見にも寄与するものと考えられる。

E. 結論

名古屋国際空港で帰国者からのインフルエンザウイルスの分離を試み30株のウイルスを分離した。流行間期にもウイルスは分離されたが、国内での流行時期と分離の傾向は一致していた。愛知県内での分離ウイルスと関連するウイルスも愛知県で分離される以前に空港で分離された。

F. 研究発表

1. 論文発表

C.Luo, T.Morishita, K.Sato, Y.Tateno, K.Nakajima, E.Nobusawa. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997. *Arch. Virol.* 144, 1881-91 1999

C.Luo, E.Nobusawa, K.Nakajima. An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus+ the inhibitory effect of Zanamivir on haemadsorption. *J.Gen.Viro.* 80, 2969-76. 1999

K.Sato, T.Morishita, E.Nobusawa, Y.Suzuki, Y.Miyazaki, Y.Fukui, S.Suzuki, K.Nakajima.

Surveillance of influenza viruses isolated from travellers at airport. *Epidem.Infect.* in press

2. 学会発表

中島捷久、信澤枝里、中島節子。キメラHA蛋白質を用いたヒト抗血清の解析。第47回日本ウイルス学会。1999年11月、横浜

中島節子、西川文雄、中島捷久。インフルエンザ感染後の抗体価の推移と再感染。第47回日本ウイルス学会。1999年11月、横浜

S.Nakajima, F.Nishikawa, K.Nakajima. Comparison of the evolution of influenza A(H1N1) viruses. The 3rd China-Japan International congress of Virology. 1999 June, Chang chun

S.Luo, E.Nobusawa, S.Nakajima, K.Nakajima. The analysis of molecular mechanism of the role of neuraminidase for receptor-binding activity of influenza B virus by GG167. The 3rd China-Japan International congress of Virology. 1999 June, Chang chun

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

アジア型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン蛋白の 抗原構造に関する研究

分担研究者 中村喜代人 山形大学医学部教授

研究要旨：1957年にパンデミーを引き起こしたアジア型インフルエンザウイルス（A/H2N2）は、1968年にはヒトの世界から姿を消した。A/H2N2ウイルスのHA分子（H2）の構造的特性が同ウイルスを短命で終わらせた可能性を疑い、H2蛋白の抗原構造の解析を行い、次の結論を得た。1）H2分子は6つの抗原領域（1-A～1-D、2-A～2-B）を持つ。1-A～1-Cは球状部先端に、2-Aは茎状部に、2-Bは球状部の底部に位置する。2）1-A～1-Dには抗原変異が起っているが、2-Aと2-Bには起っておらず、後者に対する抗体はすべてのA/H2N2分離株を同程度に良く中和する。3）1-Bと1-Cに存在するエピトープのすべては、それぞれ187位と131位への糖鎖の付加により、対応する抗体との反応性を失う。しかも131位への糖鎖の付加は、H2分子に対するポリクローナル免疫血清との反応性を大きく低下させる。4）1957年から1968年に分離されたA/H2N2ウイルスのすべては、球状部に1本の糖鎖を持つだけで（169位）、131位や187位に糖鎖を持つものは1株も存在しない。一方A/H3N2ウイルスでは、1968年分離株のHAの球状部が2本の糖鎖しか持っていなかったのに対して、現在では4～5本の糖鎖を持つに至っている。従って、H3分子が免疫からの回避に糖鎖の付加を重要な戦略として用いたのに対して、H2分子はこれができず、アミノ酸置換でしか対応できなかったと推測される。これがH2分子の可変性の喪失を早め、A/H2N2ウイルスを短命で終わらせる原因の1つになった可能性がある。

A. 研究目的

アジア型インフルエンザウイルス(A/H2N2)は1957年に新登場しパンデミーを引き起こしたが、11年後の1968年にはヒトの世界から姿を消した。このウイルスは1889年にもパンデミーを引き起こしたと推定されているが、この時も10年後には姿を消している。一方1918年登場のスペインかぜウイルス(A/H1N1)は40年間ヒトの世界に居座り、1968年登場のホンコン型ウイルス(A/H3N2)は、30年後の今でも流行を起し続けている。これらの事実は、A/H2N2ウイルスがヒトの世界で短命に終わる宿命を持っている可能性を疑わせる。A/H2N2ウイルスのヘムアグルチニン(HA)の抗原構造を詳細に解析することにより、その原因を探るのが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. 抗H2単クローン抗体の作出：A/カヤノ/57株でBALB/Cマウスを免疫することにより、17個の単クローン抗体を採取した。このうち11個は強い赤血球凝集阻止(HI)活性と中和活性を示し(グループ1)、残りの6個はHI活性を欠き、中和活性だけを持っていた(グループ2)。

2. オペレーショナルマッピング：グループ1に属する11個の抗体と、各抗体との反応性を欠く合計22個のエスケープ変異株のすべての組み合わせについてHI試験を行い、各抗体が認識するエピトープの異同を決定した。グループ2についても、各抗体とそれぞれによって選択された5個のエスケ-

ープ変異株との反応性を中和試験で調べることにより、各抗体が認識するエピトープの異同を決めた。

3. エスケープ変異株の変異部位の同定：各変異株から抽出したvRNAを鋳型とし、RT-PCR法によってHA遺伝子を増幅させた後、dideoxy法により塩基配列を決め、アミノ酸置換部位を推定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、単クローン抗体作成のためにマウスを用い、ポリクローナル免疫血清をニワトリで作成した。動物の使用匹数は最少限にとどめただけでなく、動物に対する処置も非外科的のもので、さほどの苦痛を与えるものではない。実験終了後は、麻酔下での頸椎脱臼(マウス)もしくは過剰の麻酔薬の注射(ニワトリ)で安楽死させている。

C. 研究結果

1. H2分子の抗原地図の作成：グループ1の11個の抗体並びに各抗体との反応性を欠く22個のエスケープ変異株を用いてオペレーショナルマッピングを行った結果、H2分子にはHI陽性の中和抗体を産生する抗原領域が、一部重なり合いながら4つ(1-A～1-D)存在することが明らかになった。またグループ2の6個の抗体と各抗体によって選択された合計5個の抗体を用いたマッピングにより、HI陰性の中和抗体を産生する抗原領域が少なくとも2つ(2-A, 2-B)存在すると結論された。さらに1957年から1968年までに分離された多数のA/H2N2ウイルスとの反応性を調べた結果、次の2点が明らかになった。1) 抗原領域1-Bには異なる中和エ-

ピトープが少なくとも2つ、1-Cには少なくとも5つ存在する。2) 抗原領域 2-A と 2-B に位置するエピトープは、すべての A/H2N2 分離株に保存されており、抗原変異を起こしていない。

2. 中和エピトープの位置づけ：中和エピトープの H2 分子上での位置を明らかにすべく 27 個のエスケープ変異株の HA 遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸置換部位を推定した。その結果、次の5つに要約される結論を得た。1) 1-A に対する抗体に抵抗性の変異株は 162 位もしくは 248 位のアミノ酸 (H3 の抗原領域 B) が変化していた。2) 1-B に対する抗体で選択された5個の変異株のうち4個は 187 位 (H3 の抗原領域 B) に変異を持ち、残りの1つは 137 位 (H3 の抗原領域 A) に変異を認めた。3) 1-C に対する6つの抗体の各々によって選択された 15 の変異株を見ると、13 株では 131 位 (H3 の抗原領域 A) のアミノ酸が置換しており、残りの2つは 222 位 (H3 の抗原領域 D) に変異を持っていた。4) 2-A と 2-B に対する抗体によって選択された変異株は、それぞれ 40 位 (H3 に該当領域なし) と 273 位 (H3 の抗原領域 C) に変異を持っていた。5) 以上の変異のうち、187 位と 131 位のは、双方共にレセプター結合部位近傍に新たに糖鎖結合部位を導入する変異であった。しかも 187 位の変異は 1-B を認識する2つの抗体との反応性を共に失わせ、131 位の変化は 1-C に対する6つの抗体のすべてとの反応性を消失させるものであった。

3. 1-B と 1-C に対する抗体からのエスケープの機序：上記のように、抗原領域 1-B と 1-C に対する抗体との反応性を欠くエスケープ変異株の多くは、187 位もしくは 131 位に新たな糖鎖結合部位を獲得していた。新しい結合部位に糖鎖が付加されていることは、これらの変異株の HA の分子量が親株のものより大きいことで確認された。さらに 1-B と 1-C に対する抗体が、ツニカマイシンによって糖鎖の付加を阻止したエスケープ変異株の HA とはよく反応することも認められたので、187 位と 131 位の糖鎖が、それぞれ抗原領域 1-B と 1-C に存在する中和エピトープを覆い隠すことこそ、中和を免れる機序の本態であると結論された。

4. HA の抗原性に及ぼす 187 位と 131 位への糖鎖付加のインパクト：187 位と 131 位への糖鎖の付加が、それぞれ抗原領域 1-B と 1-C に位置するすべての中和エピトープを覆い隠すとの観察は、これらの部位への糖鎖の付加が、HA 分子全体の抗原性に大きな影響を及ぼす可能性を疑わせる。そこで親株に対するポリクローナル免疫血清をニワトリで作成し、エスケープ変異株との反応性を HI 試験で調べ親株と比較した結果、次の3点が明らかになった。1) 新しい糖鎖の付加を受けないエスケープ変異株のニワトリ抗血清との反応性は親株と同じである。2) 187 位への糖鎖の付加は、免疫血清との反

応性に影響を与えない。3) ところが 131 位への糖鎖の付加は、免疫血清との反応性を 1/4~1/8 に低下させる。これらの結果は、1-C が H2 分子の主要抗原領域であるため、131 位への糖鎖の付加により 1-C 領域のエピトープのすべてがマスクされると、HA 分子全体の抗原性を大きく変化させることを示す。

5. 抗原領域 1-D に対する抗体の意義：抗原領域 1-B や 1-C に対する抗体存在下で親株を培養することにより、187 位もしくは 131 位に糖鎖を獲得したエスケープ変異株を容易に採取できる。ところが 1958/68 年に分離された A/H2N2 ウイルスの HA のアミノ酸配列を見ると、球状部に存在する糖鎖は終始 169 位の1本だけで、187 位や 131 位に糖鎖を持つウイルスは1株も出現していない。この原因を考える上で参考になる次の知見が得られた。抗原領域 1-D に対する抗体は親株に対しては弱い中和活性しか示さず、高濃度 (10 倍希釈) でも 100PFU のウイルスを完全に中和できない。ところが 187 位や 131 位に糖鎖を持つエスケープ変異株はこの抗体によって効率よく中和され、10,000 倍希釈でさえ完全に中和される。この結果は、1-D に対する抗体が感染個体に産生されれば、たとえ 187 位や 131 位に糖鎖を持つ抗原変異株が出現しても、容易に中和され淘汰されてしまう可能性を示唆する。

抗原領域 1-D の位置を決める目的で、同領域に対する抗体によって最も効率よく中和される変異株 (222 位に変異を持つ) を親として、抗 1-D 抗体による中和を免れるエスケープ変異株の採取を試みた結果、80 位もしくは 88 位 (H3 の抗原領域 E) に変異を持つものが分離された。この領域に抗体が結合しただけでは親ウイルスに対しては十分な中和活性を示さないが、レセプター結合部位近傍に糖鎖を獲得した変異株に対しては、糖鎖と協力して、HA 分子のレセプターへの結合を阻止できるものと推測される。

D. 考察

A/H2N2 ウイルスが短命で終わった原因が同ウイルスの HA 蛋白の構造的特性に基づく保証はない。しかし本研究によって、H2 分子の抗原構造に、H1 や H3 には見られていない特徴が2つ認められた。1つは、球状部の糖鎖が終始1本だけで (169 位)、11 年の流行期間中にいっさい増加しなかったことであり、もう1つは、HI 陰性の中和抗体を産生する抗原領域が存在し、これらの領域に対する抗体が 1957~1968 年のすべての分離株との間で交差反応を示したことである。以下に、この2点について若干の考察を加える。

1. HA の抗原変異における糖鎖付加のインパクト：H2 分子の 187 位に糖鎖が付加されると、1-B に存在する2つのエピトープが共に覆い隠され、

131 位に糖鎖の付加が起ると、1-C に位置する 5 つのエピトープのすべてがマスクされる。しかも 131 位への糖鎖付加はポリクローナル免疫血清との反応性を著しく低下させる。この観察結果は、もし 131 位への糖鎖の付加が自然界で起れば、疫学的に重要な抗原変異株が出現することを示唆する。しかし 11 年に亘る A/H2N2 ウイルスの流行期間中に、131 位に糖鎖を獲得した変異株は出現しなかつただけでなく、187 位に糖鎖を持つウイルスさえ分離されていない。これに対して A/H3N2 ウイルスでは、1968 年出現当時は球状部に 2 本の糖鎖しか持っていなかったが、1975 年には 3 本に、1986 年には 4 本にその数を増やしている。また A/H1N1 ウイルスでも、1934 年分離株は 1 本の糖鎖しか持っていなかったが、1977 年分離株は 4 本持っており、1986 年以降の分離株は 5 本の糖鎖を持つに至っている。これらの事実は、H1 や H3 では、球状部の糖鎖を増やすことによって中和抗体の攻撃から逃れうる変異株を効率よく産生した可能性を示唆する。一方 A/H2N2 ではこれができなかったために、抗原領域のアミノ酸置換だけで対抗せざるをえず、これが H2 分子の可変性の喪失を早め、A/H2N2 ウイルスを短命で終わらせる一因になったのではないか。H2 分子が新しい糖鎖を獲得できなかった理由は不明だが、今回の研究により、1-D に対する抗体がその出現を阻止した可能性が浮かび上がってきた。しかし 131 位や 187 位への糖鎖の付加が、A/H2N2 ウイルスの *in vitro* や *in vivo* での増殖能を低下させた可能性もあるので、その検討は今後の課題としたい。

2. 交差反応性の抗体の存在：H2 の抗原領域 2-B は、H1 や H3 の抗原領域 C に対応する。ところが H1 や H3 では、抗原領域 C に連続抗原変異が認められるのに対して、H1 では、抗 2-B 抗体はすべての A/H2N2 分離株との間で交差反応を示した。2-A に対応する抗原領域は H1 や H3 には存在しないが、この領域に対する抗体も強い交差反応を示した。これらの事実から、A/H2N2 ウイルスの反復感染を受けた個体では、2-A や 2-B に対する高力価の交差反応性抗体を獲得すると予想される。これが起れば、たとえ抗原領域 1-A~1-D に変異が生じて、交差反応性の抗体によって中和されるため、抗原変異株が出現しにくい状況が生まれると予測される。これも A/H2N2 ウイルスの寿命を縮めた一因ではないか。

E. 結論

A/H2N2 ウイルスの HA(H2)分子の抗原構造について、次の点が明らかになった。

1. H2 分子の中和エピトープは、6 つの抗原領域に分かれて存在する。4 つ (1-A~1-D) は HI 陽性の中和抗体の産生にあずかり、H3 分子の抗原領域 A,B,D 及び E に対応する部位に位置する。残

りの 2 つ (2-A, 2-B) は HI 陰性の中和抗体を産生し、2-A は茎状部に 2-B は H3 の抗原領域 C に対応する部位に位置する。

2. 抗原領域 1-A~1-D では抗原変異が起っているが、2-A と 2-B では起っていない。このため 2-A と 2-B に対する抗体は、すべての A/H2N2 分離株を効率よく中和する。

3. H2 分子の主要抗原領域は 1-C である。この領域は少なくとも 5 つの中和エピトープを持つが、そのすべてが 131 位に糖鎖が付加されると覆い隠され、その結果、H2 分子全体の抗原性が大きく変化する。

4. H1 や H3 分子は免疫からの回避に、球状部の糖鎖の数を増やすという戦略を利用したと推測される。ところが H2 分子はこれを使わず、アミノ酸置換だけで対応した。これが H2 分子の可変性の喪失を早め、A/H2N2 ウイルスを短命で終わらせる一因になったと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Influenza C virus CM2 protein is produced from a 374-amino-acid protein (P42) by signal peptidase cleavage. J. Virol. 73, 46-50, 1999.
- 2) Location of a linear epitope recognized by monoclonal antibody S16 on the hemagglutinin-esterase glycoprotein of influenza C virus. Virus Res. 61, 53-61, 1999.
- 3) A 型、B 型および C 型インフルエンザウイルス。日本臨床 57, 301-304, 1999.
- 4) Characterization of the antigenically unique influenza C strains isolated in Yamagata and Sendai Cities, Japan during 1992/1993. J. Gen. Virol. in press.

2. 学会発表

- 1) アジア型インフルエンザウイルス HA 分子の抗原構造、第 47 回日本ウイルス学会、平成 11 年 11 月、横浜
- 2) グルコースのトリミングに伴うインフルエンザウイルス HA 蛋白の抗原性の変化、第 47 回日本ウイルス学会、平成 11 年 11 月、横浜
- 3) The antigenic structure of influenza A/H2N2 virus hemagglutinin. Frontiers of RNA virus Research 2, January 2000, Kyoto.

インフルエンザウイルスの宿主域変異機構に関する研究

分担研究者 鈴木康夫・静岡県立大学薬学部生化学

自然界でブタはカモおよびヒトインフルエンザウイルスのミキサーとしての役割を果たす可能性を分子レベルで明らかにした。ウイルス受容体であるシアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc) に対する変異に必須なヘマグルチニン分子内アミノ酸を同定した。ヒト型インフルエンザウイルス⇔トリ型/ブタ型インフルエンザウイルス間の変異が、ただ一つのアミノ酸置換で起こることを実験的に明らかにした。

これらの結果は、自然界でインフルエンザウイルスがトリからブタへ、さらにブタからヒトへ伝播する機構を解明する上で極めて重要な手がかりを与えるものである。

A. 研究目的

インフルエンザA型ウイルスはヒトをはじめ多くの動物（特に、トリ、ブタ、ウマ）を宿主とし、病原性も高く、世界的規模の大流行を起こしてきた。最近（1997年）では、香港で新型のA型インフルエンザウイルス（H5N1亜型）がトリからヒトへ侵入し、18人の感染者と内6名の死者が確認された。これは、今まで確認されていなかったトリインフルエンザウイルスのヒトへの感染の最初の例となった。我々はこのようなインフルエンザウイルスの宿主域の変異がどのような分子機構で起こるのかを明らかにする研究を開始した。本研究では、先ず、自然宿主であるトリ、さらにヒト、ブタの標的組織の受容体シアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc)、シアル酸の結合様式 (Neu5Ac2-3Gal, Neu5Ac2-6Gal) を検索した。次いで、トリ、ヒト、ブタから自然界で分離されるであるA型ウイルスの受容体認識特異性を調べた。さらに、宿主域の変異（受容体シアル酸分子種、シアル酸結合様式に対する錦の変化）が、ウイルス膜ヘマグルチニン分子内のただ一つあるいは数個のアミノ酸点変異によることを初めて見いだした。

B. 研究方法

ヒト、ブタの上気道細胞、水トリ腸管

粘膜細胞におけるシアル酸分子種およびシアル酸結合様式の測定：シアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc) は Neu5Gc に対するポリクローナル抗体による組織染色によった。シアル酸結合様式 (Neu5Ac2-3Gal, Neu5Ac2-6Gal) は、それぞれの結合様式を特異的に認識するレクチン染色法によった。

C. 結果、D. 考察

自然宿主であるカモの腸管には、主として、シアル酸 (SA) α 2-3Gal が存在した。カモ腸管内でインフルエンザウイルスが増殖する細胞は陰かを形成するが、この部位には Neu5Gc 分子種が局在していた。ヒト上気道粘膜細胞には Neu5Ac2-6Gal が多く存在し、ブタの上気道粘膜細胞は、Neu5Ac2-3Gal, Neu5Gc2-3Gal, Neu5Ac2-6Gal, Neu5Gc2-6Gal の4種のシアル酸結合様式を持つことが判明した。一方、カモから分離されたA型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニンの亜型には関係なく、主として Neu5Ac (Neu5Gc) 2-3Gal を強く認識し、ヒトA型ウイルスは、Neu5Ac2-6Gal を、ブタウイルスは、Neu5Ac2-3Gal, Neu5Gc2-3Gal, Neu5Ac2-6Gal, Neu5Gc2-6Gal のいずれにも結合できることが明らかとなった。この結果から、ブタ上気道粘膜細胞には、カモ、ヒトA型インフルエンザウイルスに対する受容体シアロ糖鎖が存在するこ