

とが分子レベルで明らかに出来た。すなわち、ブタは自然界で、カモおよびヒトインフルエンザA型ウイルスのミキサーとしての役割を果たすことを明らかにした。この発見は、ウイルスの自然界における宿主間伝播機構を良く説明でき、ウイルスの宿主域変異機構を明らかにする上で極めて重要な知見である。

次いで、A型ウイルスヘマグルチニン分子内でシアル酸の分子種認識に必須な領域を調べた。我々は、ヒトから分離したA型ウイルスの中に、トリ、ブタ、ウマが持つシアル酸分子種 (Neu5Gc) を認識するウイルスと Neu5Ac のみと結合するウイルスの2種が存在することを見だし、それらのヘマグルチニン遺伝子を解析することにより両者の分子種を識別するうえで必要なアミノ酸を調べた。その結果、レセプター結合ポケット近傍の143, 155, 158番のアミノ酸が Neu5Gc の認識に重要であることを見いだした。この結果は、上記の変異により、トリ、ブタウイルスがヒトの受容体へも結合できる可能性を示しており、A型ウイルスの宿主域変異機構の解明に重要な結果である。

さらに、Neu5Ac2-3Gal, Neu5Ac2-6Gal の認識に必須なヘマグルチニン分子内領域として受容体結合ポケット内の Leu226 を見いだした。Leu226 → Gln への変位は Neu5Ac2-6Gal → Neu5Ac2-3Gal への変位を引き起こした。この結果は、上記の変異は、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示していた。このような変異は自然界でも起こり得る可能性が高く、A型ウイルスが宿主の壁を超える機構を明らかにする上で極めて重要な発見である。

以上、本年度の結果は、アジア南部で起こる新型インフルエンザウイルスの新興・再興、宿主間伝播、ウイルスの宿主域の変異を解明する上で重要な知見を提供する。さらに、継続した研究費により、本研究を展開させたい。

E. 結論

1. ブタ上気道には、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とを見いだした。
2. 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ことを分子レベルで明らかにした。
3. レセプター結合ポケット近傍の143, 155, 158番のアミノ酸が Neu5Gc の認識に重要であることを見いだした。この結果は、上記の変異により、トリ、ブタウイルスがヒトの受容体へも結合できる可能性を示していた。
4. 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。このような変異は自然界でも起こり得る可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) H. Masuda, Y. Suzuki, et al., Substitution of amino acid residue in influenza A virus hemagglutinin affects recognition of sialyl-oligosaccharides containing N-glycolylneuraminic acid. *FEBS LETT.* 464, 71-74 (1999).
 - 2) D. Kobasa, Y. Suzuki, et al., Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.*, 73, 6743-6751 (1999).
2. 学会発表
 - 1) Y. Suzuki, Host mediated variation of influenza viruses. *XVth International Symposium on Glycoconjugates*, Abstract book, ppS39, (1999), Aug. 22-27, Tokyo
 - 2) Y. Suzuki, et al., Influenza A virus receptor specificity during replication in humans and the development of synthetic polyvalent inhibitors that bind specifically to viral hemagglutinin. *XI International Congress of Virology*, Abstract Book pp. 264, (1999), Aug. 9-13, Sydney Australia

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 ----- インフルエンザBウイルスBM2蛋白の機能解析 -----

分担研究者

小田切 孝人

金沢医科大学医学部助教授

研究要旨 インフルエンザBウイルスの第7分節RNAは、膜蛋白M1および機能不明な蛋白BM2をコードしている。BM2はB型ウイルスのみがもつユニークな蛋白で、そのアミノ酸配列の98%は全てのB型ウイルスに共通している。このことはBM2はB型ウイルスの増殖にとって必須の蛋白であることをしめしている。我々は既にBM2蛋白の性状の一部を解明して、本研究班において報告した。そこで最終年度においては、感染性粒子および非感染性粒子を産生する二種類の宿主細胞を用いて、ウイルス粒子形成過程におけるBM2蛋白の機能を明らかにすることを試みた。その結果、BM2は細胞質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に関与する蛋白であることが明らかになった。

A. 研究目的

香港型インフルエンザウイルスがヒトの世界に出現してから既に32年、またソ連型ウイルスが出現してからは24年が経過しようとしている。インフルエンザウイルスは10~40年に一度の頻度で抗原大変異を繰り返して世界的な大流行を引き起こしてきた経緯からすると、近い将来に新型ウイルスが出現することが予想される。従って、この事態に備えて安全なワクチン株を速やかに製造する体制づくりが必要である。A型ウイルスにおいてはリバーシジェネティクス法によってプラスミドDNAから弱毒化ワクチンが速やかに製造できる体制が整いつつある。しかし、B型インフルエンザウイルスにおいては、ヌクレオカプシド複合体の活性が著しく弱いこと、感染性粒子作成のた

めの組み換えDNAが作り難いなどの理由から、既存のリバーシジェネティクス法をワクチン製造に応用することは、未だに困難である。そこで、B型ウイルスにおいては、全てのウイルス株で非常によく維持されている内部蛋白をコードしている遺伝子を改変して弱毒化したワクチン候補株パネルを準備しておく必要がある。

B型ウイルスの第7分節RNAによってコードされているBM2は、A型ウイルスには存在しないユニークな蛋白で、すべてのB型ウイルス株でよく保存されたアミノ酸組成をもっている。我々は、BM2蛋白を合成できない変異株やBM2蛋白をウイルス粒子に取り込めない変異株には感染性がないことを発見した。このことから、BM2遺伝子を改変することで、ユ

ユニバーサルな弱毒化 B 型ウイルスを作成できる可能性が出てきた。従って、未だに不明である BM2 蛋白の機能を明らかにすることが急務である。本研究では、このようなユニバーサル弱毒化 B 型ウイルスの作成を最終目的として、BM2 蛋白の機能を解明する。

B. 研究方法

- 1 ウイルス：B/山形/1/73、B/愛知/21/82 株。
- 2 培養細胞：イヌ腎上皮細胞由来の MDCK 細胞およびサル腎上皮細胞由来の COS-1 細胞。
- 3 ウイルス増殖：MDCK 細胞および COS-1 細胞に 10^6 PFU/cell および 5×10^{-2} PFU/cell の濃度でウイルスをそれぞれ感染させ、一段増殖および多段増殖を行わせた。
- 4 ウイルス蛋白合成の解析：ウイルス感染細胞を感染後 5、9 時間目にそれぞれ $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識して、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーにて細胞内に合成されたウイルス蛋白を検出した。また、BM2 蛋白は、抗 BM2 抗体を用いた Western Blot (WB) 法にて検出した。
- 5 ウイルス蛋白の局在の解析：感染細胞内に局在するウイルス蛋白をそれぞれの蛋白に特異的な抗体を用いた間接蛍光抗体法で検出した。
- 6 細胞内における蛋白-蛋白結合解析：感染細胞内でのウイルス蛋白どうしの結合を、動物細胞内 two-hybrid 系を用いて解析した。

C. 研究結果

- 1 異なる宿主細胞における B 型インフルエンザウイルスの増殖。MDCK および COS-1 細胞に B/山形、B/愛知株をそれぞれ感染させ、一段増殖および多段増殖を行わせた。その結果、MDCK 細胞では両ウイルス株とも、どの感染条件においても多量の感染性ウイルス粒子を産生した。一方、COS-1 細胞での一段増殖では、両ウイルス株とも MDCK 細胞と同様のウイルス産生量をしめしたが、産生されたウイルスには感染性が認められなかった。すなわち、COS-1 細胞からは感染性のないウイルス粒子が多量に産生されることが明らかになった。
- 2 感染細胞内に合成されるウイルス蛋白の検出。B/山形株を感染させた MDCK および COS-1 細胞を感染後 5 時間目と 9 時間目に $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識し、SDS-PAGE 後にオートラジオグラフィーおよび WB 法で各ウイルス蛋白合成量を経時的に測定した。その結果、BM2 蛋白を含む全てのウイルス蛋白は MDCK、COS-1 細胞で正常に合成されることが分かった。同様の結果は、B/愛知株についても見られた。
- 3 ウイルス粒子の解析。COS-1 細胞、MDCK 細胞それぞれから産生されるウイルス粒子中の蛋白およびゲノム RNA を比較検討した。その結果、主要構成蛋白 (HA, NP, M1) の含有量はどの宿主細胞から産生された粒子もまったく同じであった。しかし、COS-1 細胞から産生された感染性のない粒子にはポリメラーゼ蛋白や BM2 蛋白が殆ど含まれていなかった。さ

らに、この粒子には第6分節RNAのみが異常に多く含まれていて、その他の7本のRNA分節は殆ど含まれていなかった。

4 感染細胞内におけるBM2蛋白の局在。B/山形株を感染させたMDCKおよびCOS-1細胞におけるBM2蛋白の局在を経時的に解析した。MDCK細胞内では、BM2は合成直後は核膜外周に沿って検出されたが、時間の経過とともにウイルス粒子の出芽部位である細胞膜近傍へと移動した。その結果、産生されたウイルス粒子中にもBM2蛋白が検出された(既報)。一方、COS-1細胞内では、BM2蛋白は感染サイクルを通じて核膜外周に限局して存在した。このことから、この細胞から産生されたウイルス粒子にはBM2蛋白が取り込まれないものと考えられた。

5 発現ベクター導入細胞でのBM2蛋白の局在。MDCK細胞内でのBM2蛋白の輸送機構をさらに詳細に調べるために、BM2発現ベクター単独、BM2に加えてM1およびNP発現ベクターをそれぞれ混合して導入した細胞内のBM2、M1、NP蛋白の局在を二重染色法にて解析した。BM2蛋白を単独で発現させると、BM2は細胞質全体に広く拡散した状態で存在していた。この局在パターンはNPを共発現させても変わらなかった。一方、BM2とM1蛋白を共発現させると、BM2の一部は細胞膜近傍に蓄積した。このことから、BM2蛋白の細胞質内輸送にはM1蛋白が必要であると考えられた。

6 BM2蛋白と結合するウイルス蛋白の同定。我々は既に、ウイルス粒子内ではBM2はM1蛋白と弱いながら結合してい

ることを報告した。そこで、感染細胞内でBM2-M1複合体を形成するの否かを明らかにするために、哺乳動物細胞内two-hybrid系を用いて、BM2と結合するウイルス蛋白の同定を試みた。その結果、BM2はNP蛋白とは結合しないが、M1およびNS2蛋白と結合することが明らかになった。

D. 考察

インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドはゲノムRNA、ポリメラーゼ蛋白、NP蛋白およびそれに付随したM1、NS2蛋白の複合体からなる。MDCK細胞から産生される感染性のあるB型ウイルス粒子には、ヌクレオカプシドとBM2が正常に含まれているが、COS-1細胞から産生された感染性のない粒子には、ヌクレオカプシドもBM2蛋白も含まれていなかった。このことは、B型ウイルスではBM2蛋白もヌクレオカプシド複合体の一部を構成していることを示唆している。これは、細胞内でBM2-M1、BM2-NS2複合体が形成されるという成績からも支持される。さらにCOS-1細胞では、BM2蛋白が核膜外周に留まったままで、細胞膜へは移動しない。このことは、COS-1細胞内では、ヌクレオカプシドとBM2が正常に結合していない可能性が考えられる。上述の如く、COS-1細胞から産生された粒子にはヌクレオカプシドがパッケージングされないことから、ヌクレオカプシド-BM2複合体形成がヌクレオカプシドの細胞質内輸送やウイルス粒子へのパッケージングにとって不可欠であるのかも知れ

ない。このことは逆に、感染性のない弱毒ウイルスを作成するためには、BM2 蛋白を欠損させればいいことを意味している。

E. 結論

B 型インフルエンザウイルスにおいては、BM2 蛋白は M1、NS2 蛋白と結合してヌクレオカプシド複合体を構成し、ヌクレオカプシドの細胞質内輸送およびパッケージングに参与する。BM2 蛋白欠損粒子は感染性がないことから、BM2 蛋白は B 型ウイルスの弱毒化のための標的となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Odagiri, T., Hong J. and Ohara, Y. The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J. Gen. Virol.* 80, 2573-2581 (1999)

Obuchi, M., Odagiri, T., Iizuka, H., and Ohara Y. Expression of lymphotoxin gene inserted into Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Microbiol. Immunol.* 43, 83-86 (1999)

Obuchi, M., Yamamoto, J., Uddin, N.M., Odagiri, T., Iizuka, H. and Ohara, Y. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) subgroup strain-specific infection in neural and non-neural cell lines. *Microbiol. Immunol.* 43, 885-892 (1999)

小田切 孝人 インフルエンザウイルスの分子生物学 (1)ゲノム構造と感染増殖機構。治療学 34, 27-32 (2000)

2. 学会発表

T. Odagiri, Jin Hong, and Y. Ohara. The BM2 protein on influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. 11th International Congress of Virology, Sydney, August (1999).

小田切 孝人、小淵 正次、大原義朗 インフルエンザ B ウイルス BM2 蛋白欠損粒子は干渉性欠損(DI)ウイルスとなる。第 36 回日本細菌学会中部支部総会。金沢、10 月 (1999)

小田切 孝人、大原義朗 B 型インフルエンザウイルス BM 2 蛋白の性状と機能。第 47 回日本ウイルス学会総会、横浜、11 月 (1999)

小淵 正次、小田切 孝人、大原義朗 マクロファージにおける Theiler ウイルスの増殖に果たす L*蛋白の役割。第 47 回日本ウイルス学会総会、横浜、11 月 (1999)

小田切 孝人、大原義朗 インフルエンザ B ウイルス BM 2 蛋白の性状解析。第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 (1999)

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

(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

研究要旨 1957年春に新型のアジアかぜA (H2N2) インフルエンザウイルスが出現し大流行を起こしたが、このウイルスは1968年夏に新型の香港かぜA (H3N2) インフルエンザウイルスが出現したときには消失した。約11年間の流行の間に日本および世界の各地で分離されたA (H2N2) ウイルスの血球凝集素 (HA) 遺伝子およびHA蛋白質の分子進化を調べると、両者は同じ様な分子進化をとげていた。1957年の出現後、1959年、1960年と進化していたが、1962年のウイルスは1960年の流行ウイルスに由来したのではなく、1957年あるいは分子進化していない1959年のウイルスに由来し、大きく変化していた。1964年のウイルスは1962年のウイルスから更に進化していた。1964年以降1968年までのウイルスは進化的に異なる複数のグループに分かれたが、分離年との相関はみられなかった。

A. 研究目的

現在流行している香港かぜA (H3N2) インフルエンザウイルスが出現してから31年、ソ連かぜA (H1N1) インフルエンザウイルスが出現してから22年が経過しており、近い将来新型インフルエンザウイルスが出現して大流行を起こすことが予想されるが、出現の時期については不明である。過去のアジアかぜA (H2N2) インフルエンザウイルスの血球凝集素 (HA) 遺伝子およびHA蛋白質の分子進化を解析して、新型インフルエンザウイルス出現の時期の推定に役立たせることができるかどうかを調べた。

B. 研究方法

ウイルス：凍結保存あるいは凍結乾燥保存されていたA (H2N2) インフルエンザウイルス株をそのままRT-PCRに用いた。RT-PCR：RNAの抽出には市販の Isogen-IS (ニッポンジーン) を用い、cDNAの作製にはTaKaRa Ex Taq を用いた。プライマー：A (H2N2) ウイルスのHA遺伝子全体をカバーする3ペアーを用いた。塩基配列の決定：PCR産物をカラム (キアゲン社) を用いて精製した後、Bigdye Terminator Cycle Sequencing Kit (PEアプライドバイオシステム社) を用いて反応させた後、カラム (PEアプライドバイオシステム社) を用いて精製し、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。PCRのバンドが複数本生じた場合には、PCR産物を

Tベクター (Novagen) へ組み込んだ後、M13 Universal primers を用いてPCRを行い、PCR産物の塩基配列を決定した。進化系統樹：Neighbour-Joining (NJ)法による Phylogenetic tree および Mainstream-sidestream (MS)法による進化系統樹を作成した。NJ法はGenetyx-Mac version 10のプログラムを用い、MS法はNakajimaらの方法(1988)を用いて行った。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

1957年から1967年までに国内で分離されたA (H2N2) ウイルス15株および1967年から1968年に外国で分離された3株についてHA遺伝子の塩基配列を決定した。更に、塩基配列からアミノ酸配列を推定した。既に報告されている9株のA (H2N2) ウイルスの塩基配列およびアミノ酸配列の結果を加えて、1957年から1968年までのA (H2N2) ウイルスのHA遺伝子およびHA蛋白質の進化系統樹を作成した。A (H2N2) HA遺伝子は1957年の出現以降1959年、1960年と進化していたが、1962年のウイルスのHA遺伝子は1960年の流行ウイルスに由来しておらず、1957年のウイルスあるいは分子進化していない1959年のウイルスに由来し、26個の主流の変化をきたしていた。1964年のウイルスは1

1962年のウイルスから更に進化しており、1964年以降1968年までのウイルスは進化的に区別される複数のグループ、即ち12個の主流の変化をきたしているグループ、更に8個の主流の変化をきたしているグループ、および更に3個の主流の変化をきたしているグループ(2つのサブグループに分かれる)に分かれていたが、分離年とは相関が認められなかった。HA蛋白質もHA遺伝子とほぼ同様の分子進化をしていたが、1957年のウイルスと1959、1960年のウイルスの間には1アミノ酸の主流の変化がみられたことと、1964年以降1968年までのウイルスは進化的に異なる2グループ(1つのグループは更に3つのサブグループに分かれる)に分かれていたことが遺伝子の進化系統樹と異なっていた。1957年のアジアかぜ出現直後のウイルスはHAポリペプチドの226番目と228番目の両方が変化しているウイルスと変化のみられないウイルスが存在したが、変化の見られないウイルスがその後の主流のウイルスになった。

D. 考察

アジアかぜA(H2N2)インフルエンザウイルスのHAの分子進化の速度は1957年から1968年の11年間でHA遺伝子に49個の主流の変化が、HA蛋白質に19個の主流の変化が起こっていた。進化の速度はHA遺伝子は 2.57×10^{-3} bases/site/year、HA蛋白質は 3.13×10^{-3} amino acids/site/yearであったが、他の(亞)型のウイルスと比較するためにHA1部分だけの分子進化の速度をみると、それぞれ 3.50×10^{-3} bases/site/year および 4.70×10^{-3} amino acids/site/year となり、H1N1およびH3N2ウイルスの進化速度に較べると少し遅いが、B型ウイルスに較べると約2倍早い(Cox & Bender, 1995)。1957年に出現してから4年間は分子進化をおこしておらず、また1964年以降のウイルスも分子進化と分離年との間に相関が認められず、HA遺伝子およびHA蛋白質はそれぞれ進化的に区別される3および2グループに分かれた。しかし、日本の分離ウイルスだけを解析すると、一定の方向への分子進化が認められた。1968年に出現した新型のA(H3N2)インフルエンザウイルスはHAと塩基性ポリメラーゼ1(PB1)以外の遺伝子はA(H2N2)インフルエンザウイルスに由来していることがわかっている(Fang et al., 1981; Kawaoka et al., 1989)。以前われわれが行っ

た研究ではA/Aichi/2/68(H3N2)ウイルスのNAおよびNS遺伝子はA/Poland/6/67(H2N2)ウイルスの遺伝子にもっとも近い塩基配列をもっていた(Nakao et al., 1993)が、このウイルスのHA遺伝子はA(H2N2)ウイルスのなかでもっとも進化したグループに属していた。H2N2ウイルスの抗原性は1957年に出現して以降1962年までは殆ど変化がみられず、1964年に抗原変異を少し起こしたウイルスが分離され、1965年に更に少し抗原性が変わったウイルスが流行したが、その後は抗原変異を起こしていない(福見, 1964, 1967)。全期間を通じてA(H2N2)ウイルスの抗原変異はあまり大きなものではなかった。HA蛋白質の分子進化の系統樹では1962年のウイルスは1957年のウイルスから10個の主流のアミノ酸の変化を起こし、これらの変化は主にHA蛋白質の抗原部位BおよびDに位置していたがウイルスの抗原性には影響しなかったと考えられる。1959、1960年のウイルスは1957年のウイルスから1個の主流のアミノ酸の変化(アルギニン)がみられたが、これらのウイルスと以降のウイルスのアルギニンは別々のコドンによりコードされていた。1964年以降のウイルスは同じサブグループの株間で共通の変異が認められたが、出現直後のウイルスと比較して多くの株特異的な変化をもっていた。アジアかぜA(H2N2)ウイルス出現直後の1957年のウイルスはヒト感染回復期血清との反応性が高い株と低い株が共存していた(Fukumi, 1959)。また、この現象とは別に、ウマ血清中のインヒビターに感受性のある株とない株も共存し(Purnell et al., 1960)、これらの二つの現象の間に相関は特に認められていなかった。本研究で解析した1957年の日本の4株のうち3株は感染回復期血清に対する反応性が低く、かつウマ血清中のインヒビターに感受性がなかったが、これらのウイルスはいずれも226番目と228番目のアミノ酸がグルタミンとグリシンでウマ血清中のインヒビターと反応しないことが知られているA/RI/5-/57 および A/Japan/305-/57 と同じアミノ酸をもっていた(Connor et al., 1994)。これらのウイルスはこの2カ所以外には共通するアミノ酸の変異はもっておらず、感染回復期血清に対する反応性と特定のアミノ酸の変異の関係はHA蛋白質の中には見あたらなかった。

E. 結論

アジアかぜA (H2N2) インフルエンザウイルスのHA遺伝子およびHA蛋白質は1957年に出現して1968年に消失するまで、他の亜型のA (H1N1) およびA (H3N2) ウイルスに較べて分子進化の速度がやや遅かったが、B型ウイルスよりは早く分子進化していた。1964年以降のウイルスは進化学的に異なる複数のグループが混在していたが、このことと新型A (H3N2) インフルエンザウイルスの出現との関連はわからなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

中島節子 (1999). インフルエンザの流行と抗原変異. 公衆衛生研究48, 274-281.

2. 学会発表

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

西川文雄, 秋田美千代, 中島節子. インフルエンザ反復感染の追跡調査. 第47回日本ウイルス学会. 1999年11月, 横浜

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

Setsuko Nakajima, Fumio Nishikawa, Katsuhisa Nakajima. Comparison of the evolution of influenza A(H1N1) viruses between recent and old A (H1N1) viruses. The 3rd China-Japan International Congress of Virology, 1999 June, Changchun

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, Changchun

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 (新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 黒田 和道 大阪薬科大学助教授

研究要旨 K^k 拘束性インフルエンザウイルス NP 特異的 CTL クローン NP102 と H-2 K^k 遺伝子導入 MDCK を用い、CTL によるウイルス増殖抑制能の *in vitro* 解析系を確立したことを昨年度に報告している。本年度は、この系を用い NP102 がウイルスの放出を抑制し得る条件を更に解析した。NP102 は、PR8 (H1N1) 株および Udorn (H3N2) 株のどちらのウイルスで感染された MDCK- K^k 細胞からもウイルスの放出を抑制した。この抑制には、MDCK- K^k 細胞に対して 5 倍以上の細胞数の NP102 が必要であった。さらに PR8 株を感染した MDCK- K^k 細胞中でのウイルスタンパク合成量は、NP102 存在下と非存在下の間で少なくとも感染 10 時間目まで差異は観察されず、後期タンパク質である HA および M1 タンパク質も合成された。以上の結果は、CTL によるウイルス放出の抑制はインフルエンザウイルス感染後期過程の阻害によることを示唆するとともに、抗インフルエンザウイルス CTL を効率良く誘導できれば亜型を超えた感染防御の成立が可能であることを示唆している。

A. 研究目的

インフルエンザ対策における最も大きな問題は、現行ワクチンにより誘導される中和抗体が認識する抗原、HA と NA タンパク質が、その抗原性を容易に変異することであろう。一方、インフルエンザウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) が認識する主な抗原は NP や M1 タンパク質などの内部タンパク質であり、比較的その抗原性が維持されている。したがって、CTL が感染防御能を持つならば、CTL を誘導するワクチンを開発することにより現行ワクチンの弱点を補うことができる可能性がある。そこで本研究では、CTL による感染防御能を検証する目的で、CTL によるウイルス産生抑制活性の検討を昨年度に引き続き行った。

B. 研究方法

インフルエンザウイルスは、A/PR/8/34 (H1N1; PR8) および A/Udorn/72 (H3N2; Udorn) を用いた CTL は、 K^k 拘束性 NP 特異的 CTL クローン NP102 を用いた。NP102 は PR8 株の NP タンパク質の 50 から 57 番目のアミノ酸をエピトープとし

て認識する。NP102 の維持は、処女マウスの脾臓細胞を PR8 株で感染後 X 線照射することにより調製した刺激細胞を、1 週間ごとに加えることにより行なった。また、NP102 の感染細胞に対する影響を解析する実験では、LSM により刺激細胞を除いた後 NP102 を用いた。

感染細胞からのウイルスの産生の解析は、培養上清中の HA 価を測定することによって行なった。

MDCK- K^k 細胞は、MDCK 細胞に K^k 遺伝子を導入し、 K^k 遺伝子を恒常的に発現する細胞である。

蛍光抗体法および免疫ブロット法によるインフルエンザウイルスタンパク質の同定には、PR8 株で免疫したウサギより調製した血清を用いた。

C. 研究結果

NP102 が PR8 株感染 MDCK- K^k 細胞からのウイルスの放出を抑制し、NP102 が認識するエピトープ配列を持たない B 型ウイルス感染では抑制が起こらないことは、昨年報告している。この CTL によるウイルス産生抑制活性のエピトープ依存性

をさらに検討するために、A 型ウイルスであり NP102 のエピトープ配列を持つが、PR8 株とは異なる亜型に属する Udorn 株による感染に対する NP102 の影響を調べた。MDCK-K^t 細胞に Udorn 株を感染し、1 時間後に NP102 を重層すると、培養上清中へのウイルスの放出は、PR8 株感染の場合と同様に、ほぼ完全に抑制された。一方、Udorn 株を感染させた MDCK 細胞では、NP102 の存在はウイルス増殖に影響を与えなかった。

ウイルスの放出を抑制するために必要な NP102 の細胞数を検討するために、PR8 株感染 1 時間後に、MDCK-K^t 細胞に種々の細胞数の NP102 を重層しウイルス放出への影響を調べた。MDCK-K^t 細胞に対し 5 倍以上の細胞数の NP102 を重層した場合には、培養上清中へのウイルスの放出はほぼ完全に抑制された。2 倍から 1 倍の NP102 を重層した場合には、その効果は減弱するものの抑制効果は観察された。しかしながら、0.1 倍以下の NP102 を重層した場合には、NP102 によるウイルス放出抑制効果はもはや観察されなかった。

NP102 によるウイルス放出抑制が、ウイルスタンパク質合成阻害によるかどうかを、蛍光抗体法および免疫プロット法により解析した。MDCK-K^t 細胞に PR8 株を感染させ 1 時間後 NP102 を重層し、その後適当な時間ごとに、MDCK-K^t 細胞のみを固定するか、あるいは、全細胞 (MDCK-K^t 細胞と NP102 の両方) を SDS により溶解した。前者は蛍光抗体法の、後者は免疫プロット法の試料とした。どちらの方法によっても、少なくとも感染 10 時間後までは、NP102 の存在は MDCK-K^t 細胞でのウイルスタンパク質合成に影響は与えなかった。この結果は、CTL によるウイルス産生抑制が、ウイルス感染後期過程への作用によるものであることを示唆している。

D. 考察

ウイルス放出抑制に感染細胞数の 5 倍程度の CTL が必要であるとの結果は、⁵¹Cr 放出法により測定された CTL の細胞傷害活性の結果とは一見矛盾する。NP102 が標的細胞に対して同細胞数以上

存在すれば、傷害活性は最大値を示す。この両活性における差異は、細胞傷害を受けた細胞であってもウイルスを産生し得ることを示唆する。このことは、NP102 がウイルス産生を抑制する条件下でも、ウイルスタンパク質が正常に合成される結果によっても支持される。細胞傷害はアポトーシス誘導の結果であるとされており、インフルエンザ感染自身がアポトーシス誘導の引き金になっていることを考慮すると、アポトーシスのみではインフルエンザウイルスの産生を抑制し得ないことを示しているのかもしれない。

NP102 は、インフルエンザウイルスの内部タンパクである NP を抗原として認識し、そのエピトープは亜型を超えて保存されている。したがって、NP102 のウイルス放出抑制活性は、この CTL を樹立する際に用いられた PR8 株に対してだけでなく、他の亜型に属するウイルスに対しても働くことが期待された。実際、NP102 は Udorn 株感染細胞からのウイルス放出も抑制することが示された。このことは、CTL を誘導し得るワクチンが開発されれば、少なくとも現行のワクチンよりも、それはインフルエンザウイルスの抗原変異に対して抵抗性を示すであろうことを期待させる。ただし今回の結果からも幾つかの問題の存在が明らかである。例えば、ウイルスの放出を完全に抑えるためには、感染細胞の 5 倍程度の CTL が必要であり、しかも、感染の初期から CTL が存在することが必要なことである。このような状態をワクチン接種により実現することが可能であるかどうかについては今後の検討が必要であろう。もっとも、必ずしも感染と同時に大量の CTL が必要では無いかもしれない。若干遅れて CTL が供給されたとしても、感染個体内での感染の進展を抑え、病状の軽症化をもたらすには十分であるかもしれないからである。この点に関しても、更なる検討が必要であろう。

E. 結論

抗インフルエンザウイルス CTL は、亜型を越えてウイルス産生を抑制し得ることが示された。

この結果は、CTL が異なる亜型のウイルスに対しても感染防御能を持ち得ることを示しており、ワクチン開発において CTL 誘導能を検討することの必要性を示唆するものである。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

インフルエンザウイルス特異的 CTL によるウイルス増殖抑制の解析

芝田敏克、小田就昭、黒田和道；第 47 回日本ウイルス学会、東京

インフルエンザウイルス M1 タンパクの核内構造 POD への集積

佐藤佳子、吉岡健一、黒田和道；第 47 回日本ウイルス学会、東京

M1 protein of influenza virus interacts with the pml nuclear structure

Yoshiko Sato Kazumichi Kuroda; 11th international congress of virology, Sydney

Microscopic study on binding of influenza virus to Group B streptococcus with SAA2, 3 gal linkage

Y. Hosaka, A. Ikeura, K. Kuroda, Y. Suzuki; 11th international congress of virology, Sydney

Development of a new Influenza Virus vaccine vector using a helper-virus-free reverse genetics system

Masayoshi Enami, Kazumichi Kuroda, Kazue Enami; 11th international congress of virology, Sydney

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

分担研究者： 山形県衛生研究所微生物部
水田克巳

研究要旨 現在進められているインフルエンザ対策の1つが、発生動向調査である。我々は、仙台市において1991年から年間を通じてインフルエンザを含む小児のウイルス性急性気道感染症のウイルス分離に基づく疫学研究を行ってきた。今回は、発生動向調査の強化の1つとして、ウイルス分離に加えて分子生物学的な手法の導入を試みた。即ち、各シーズンの仙台代表株30株について、感染防御上重要とされるHA1部分の321アミノ酸のpartial sequenceを行った。その結果、解析株は現行ワクチンのシドニー株を基準とすれば6-22ヶ(各シーズン間でおおよそ2-7ヶ)のアミノ酸変異が起っていた。仙台株の大きなアミノ酸変異の流れとしては、各シーズン代表株のA/滋賀/2/91→A/北九州/159/93→A/武漢/359/95→A/シドニー/5/97の流れに沿うものであった。しかしながら、興味深い観察としては、91/92シーズンに96/97シーズンの株の類似株が、また94/95シーズンに98/99シーズン株の類似株が各1株ずつ先行して分離されていたことである。後の代表株の類似株が4-5シーズン前からすでに分離される現象が普遍的におこっているとすれば、発生動向調査を行い、将来的にワクチン開発に結び付けていく上ではきわめて大切な視点となる。インフルエンザ対策にあつては、長期的視野にたった堅実な発生動向調査の強化が重要であることがあらためてうきぼりとなった。

1. 研究目的

インフルエンザウイルス感染症は、高齢者などハイリスク群の重症化、小児の脳炎・脳症、香港における新型インフルエンザの出現など大きな社会問題であり、有効な対策が望まれている。対策の1つが発生動向調査の強化である。我々は、仙台市において1991年よりウイルス分離に基づく小児の急性気道感染症の疫学研究の中で年間を通じたインフルエンザウイルスの発生動向調査を行ってきた。今回は、インフルエンザウイルスの中

でも特に対策が叫ばれているA香港型について、感染防御に重要かつ、変異が多いとされるHA1の部分について仙台市で分離された過去のウイルスストック株を用いて、partial sequenceによる比較を試みた。

2. 方法

1991年1月から1999年3月までに仙台市永井小児科医院を訪れた急性気道感染症を呈した小児のべ17,516人の咽頭拭い液から、MDCK細胞を含むマ

マイクロプレート法によりウイルス分離を行った。分離されたインフルエンザウイルスは国立感染症研究所から分与された、又はデンカ生研から購入した抗血清(HI法)で型を同定した。

MDCK細胞で分離され、A香港型と同定されたウイルス株について、各シーズンから代表株をランダムに選び、HA1のpartial sequenceの対象とした。ストックされていたウイルス液からRNAを抽出、RT-PCRの後、Ellis J.S. (Arch Virol 140:1889-1904, 1995)らの方法に準じてAH3GとAH3Iの2つのプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物について、大腸菌に組み込みクローニングの後、partial sequenceを行った。なお、シーケンス解析にあたっては更に2つのプライマーを内部に独自に設定した。

3. 結果と考察

調査期間に永井小児科で2,909株のインフルエンザウイルスを分離した。A香港型は1,338株であった。A香港型はすべてのシーズンで分離され、週別ウイルス分離数、今回解析した株は図1に示した通りである。なお、ここではウイルス株名については国立仙台病院ウイルスセンター方式をそのまま用いた。

93/94、94/95シーズンの仙台市の分離株の解析結果(国立感染症研究所で解析されたデータ)及び現在のワクチン株、シドニー株のアミノ酸配列はインターネットでGenbankから引用した。その結果、シドニー株を基準

にとると、解析した株は6-22ヶのアミノ酸変異(91-98%のアミノ酸相当性)があることがわかった。各シーズン間ではおよそ2-7ヶの変異であった。株間で比較すると全く同じアミノ酸配列は2組み(97N-751&98N-56、98N-1629&98N-1630)のみであった。

解析株のアミノ酸配列のうち変異が集積していると思われる部分を抜粋して表に示した。95/96シーズンまでは解析数が1-2株と少ないが、当時の代表株とされたA/滋賀/2/91、A/北九州/159/93、類似の株が仙台で循環し、その後A/武漢/359/95、シドニー/5/97類似株へ移行していく過程がとらえられた。

興味深い観察としては、91/92シーズンに96/97シーズンの株の類似株として92N1069が、また94/95シーズンに98/99シーズン株の類似株として95N653が各1株ずつ分離されたということである(図2の系統樹参照)。こうした現象が普遍的におこっているかという点についてはまだ観察を続けていく必要がある。しかし、後の代表株の類似株が4-5シーズン前からすでにコミュニティーに先行して現れているとすれば、発生动向調査の視点を現在の1-2シーズンよりも長いスパン(少なくとも4-5シーズン)におくべきであろう。

一方、97/98シーズン以降はシドニー株類似株が仙台でも循環しているが、14株を解析した98/99シーズンでは、11-12月までに分離された株

(98N1629-1757)と1月以降に分離された株(99N1-490)で31,92,137,207,268,269,280番の7ヶ所のアミノ酸変異が認められている。

4. 結論

インフルエンザ対策にあつては、長期的視野にたった堅実な発生動向調査の強化が重要であることがあらためてうきぼりとなった。特に今回の研究結果からは、4-5シーズンという長期的視点をもってウイルス株を解析していく必要があることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Murayama N., Suzuki H., Arakawa M., Nerome K., Mizuta K., and Kameyama K.: Two outbreaks of Influenza A(H3N2) in a Japanese nursing home in the winter of 1996-1997, with differing vaccine efficacy. *Tohoku J. Exp. Med.* 188:289-298, 1999

2) 水田克巳、永井幸夫、近江彰、斎藤郁子、鈴木宏：インフルエンザのすべて。ウイルスの分離と血清診断。感染と抗菌薬 2:376-379, 1999

2. 学会発表

1) 水田克巳、永井幸夫、宮本勉、鈴木宏：仙台市におけるインフルエンザ A 香港型 HA1 部分抗原決定領域のシーケンス解析の試み
第14回インフルエンザ研究者交流会 1999, 2/27-3/1, 於新潟県八海山

2) 松寄葉子、菅原勘悦、高下恵美、本郷誠治、中村喜代人、水田克巳、宮本勉、鈴木宏：1992-93年に仙台市と山形市で分離された3株のC型インフルエンザウイルスはブラジル由来か？
第14回インフルエンザ研究者交流会 1999, 2/27-3/1, 於新潟県八海山

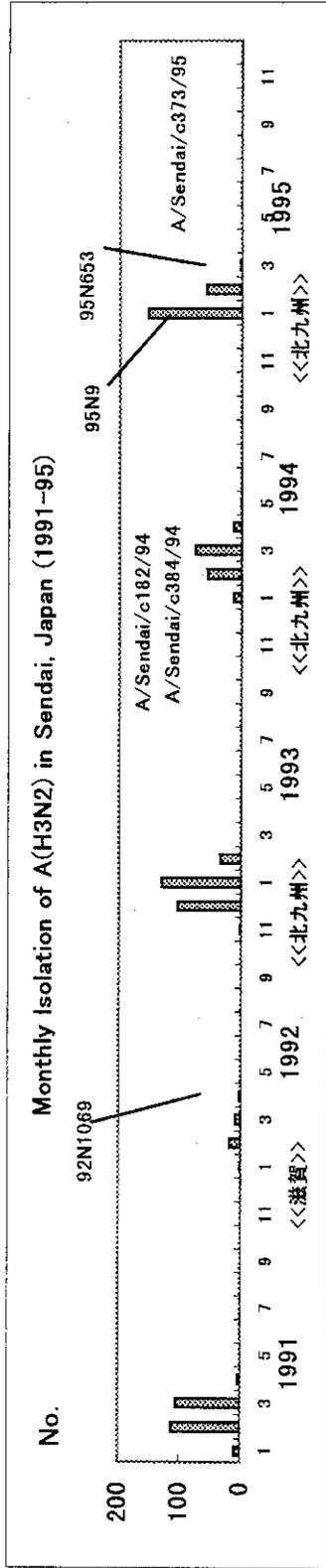
3) 松寄葉子、中村喜代人、水田克巳、宮本勉、勝島矩子、坂本美千代、本郷誠治、鈴木宏：1996年と1998年に山形県内でとらえられたC型インフルエンザの流行
第40回日本臨床ウイルス学会 1999, 5/13-14, 於大阪

F. 研究協力者

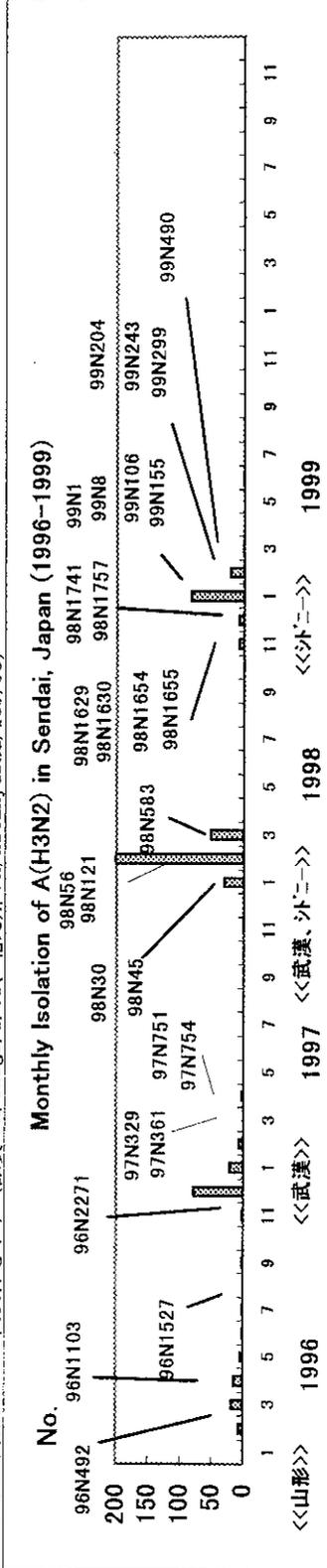
永井小児科医院 永井幸夫
国立仙台病院ウイルスセンター 岡本道子
新潟大学医学部公衆衛生学 鈴木宏
医療法人掬水会老健施設エバグリーン名取 宮本勉
山形大学医学部細菌学教室 中村喜代人

表 インフルエンザA香港型仙台株と代表株のアミノ酸配列と変異 (抜粋)

株名 (囲みは同シーズン株)	31	62(E) 92(?)	121(A?) 124, 133, 135, 137, 142, 144-5(A)	156-8(B)	196(B) 207(D) 226(B)	262, 268-9(E) 276, 278, 280(C)
A/Shiga/2/91	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YR	TKR	RTG IMR
A/Kitakyushu/159/93	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
92N1069	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
A/Sendai/c182/94	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YR	TKR	RQ IMR
A/Sendai/c384/94	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YR	TKR	RQ IMR
A/Sendai/c373/95	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
95N9	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
95N653	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
96N492	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
96N1103	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
96N1527	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
96N2271	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
97N329	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
97N361	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
97N751	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
97N754	TND	GKN STA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
A/Wuhan/359/95	TND	GKN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
A/Sydney/5/97	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N30	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N45	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N56	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N121	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N583	TND	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1629	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1630	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1654	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1655	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1741	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
98N1757	TND	GEN SBA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N1	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N8	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N106	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N155	TSD	GEN TKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N204	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N243	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N299	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR
99N490	TSD	GEN SKA	INLNFNWTGVAQNGTSSYACKRGSISFFSRLNWLHLHQLKYPALNVTMPNNDK	YQ	TKR	RQ IMR



*1ただしA/Sendai/c182/94, A/Sendai/c384/94, A/Sendai/c373/95はGenbankからの引用
 *2<<>>内はシーズンの代表株を示す (滋賀 : A/Shiga/2/91、北九州 : A/Kitakyushu/159/93)



*3<<>>内はシーズンの代表株を示す (山形 : A/Yamagata/32/89、武漢 : A/Wuhan/359/95、汨羅 : A/Sydney/5/97)

図1 仙台におけるインフルエンザウイルスA香港型月別分離数とシーズン解析株

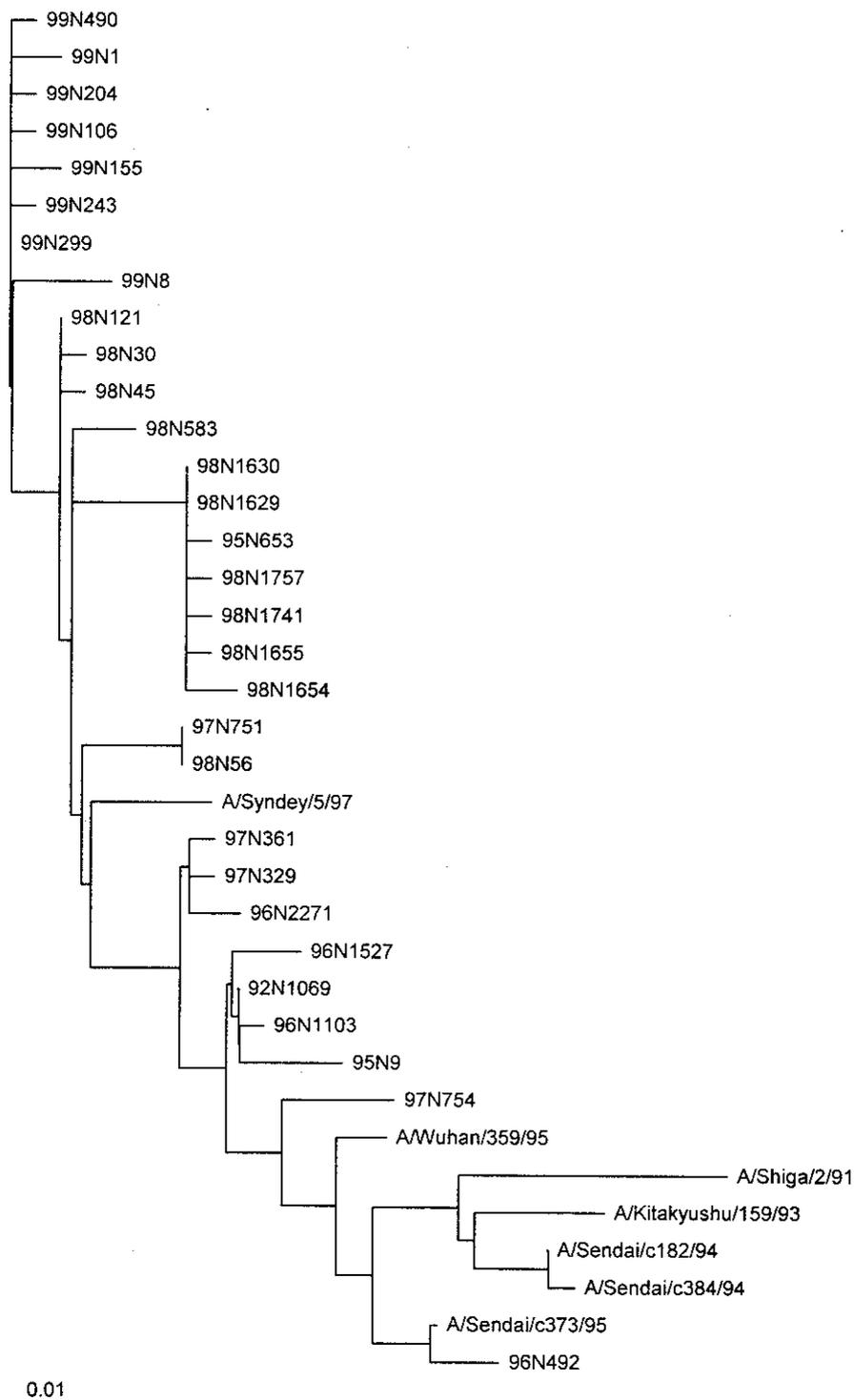


図2 インフルエンザA香港型仙台株と代表株の
HA1parital sequence に基づく系統樹(NJ法)
*ただし仙台株の命名は国立仙台病院ウイルスセンター方式による

インフルエンザウイルス感染症の迅速診断、FLU OIA の検討

分担研究者 菅谷 憲夫 日本鋼管病院小児科長

研究要旨 A型インフルエンザウイルスの迅速診断(Directigen Flu A)が保険適応となり、日本国内でも広く使用されるようになった。アマンタジンのA型インフルエンザ感染症の治療適応が認められたことも重なり、A型インフルエンザウイルスの迅速診断は、多くの病院でルーチンの検査となった。最近、A型、B型、両インフルエンザウイルスを検出する迅速診断キットが開発された。FLU OIA (BioStar社、USA)であるが、その有用性を検討した。Optical Immunoassayにより、A、B型インフルエンザウイルスを検出する迅速診断キットFLU OIAでは、A型とB型を区別して判定することはできない。ウイルス分離と比較して、鼻咽頭吸引液42検体では、感度80.0%(8/10)、特異度68.8%(22/32)、咽頭スワブ61検体では、感度36.7%(11/30)、特異度83.9%(26/31)であった。鼻咽頭吸引液の方が咽頭スワブより感度が良く、A型インフルエンザの方がB型インフルエンザよりも、検出率が高い傾向が認められた。B型インフルエンザも、重症合併症や施設内流行の原因となる事があり、ノイラミニダーゼ阻害剤、ザナミビルも、最近、日本で承認された事から、A、B型とも検出できる迅速診断キットの有用性は高いと考えられる。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは、毎年流行を繰り返し、人口の5-10%が罹患する。日本では、毎年、600-1200万人のインフルエンザ患者が発生していると考えられる。最近、脳炎脳症や、施設内流行による死亡例などが報告され、その重要性が認識されてきている。1998年、アマンタジンがA型インフルエンザに適応となり、1999年には、A型、B型インフルエンザの両方に効果のあるノイラミニダーゼ阻害剤、ザナミビルも承認され、インフルエンザに対するアプローチは、ワクチンに加えて、治療の対象とする積極的な方向に向かいつつある。

このような状況では、インフルエンザを迅速に診断することが求められるが、一般的に行われている血清抗体検査やウイルス分離は、その要求に応えることができない。1999年1月に国内でも発売されたDirectigen Flu A(日本ベクトン・ディッキンソン社)は、感度、特異度とも高く、A型インフルエンザの迅速

診断に有用であるが、欧米ではA、B型インフルエンザウイルスを同時に検出するキットもすでに発売されている。その代表的な、FLU OIA (BioStar社、USA)について、小児を対象として有用性を検討した。

B. 研究方法

1) FLU OIA

FLU OIAは、インフルエンザウイルスの核蛋白に対する抗体を用いて、optical immunoassayによりA、B型インフルエンザウイルスを同時に検出するキットである。添付の綿棒に検体を取り、抽出用チューブに希釈液3滴、抽出液2滴を混合した中で攪拌し、3分置く。そこにペルオキシダーゼ標識抗A、B型インフルエンザウイルス抗体を結合させ、反応装置に1滴滴下し6分間反応させる。洗浄後、基質1滴を滴下し、再び6分間反応時間をおき、洗浄、判定する。反応装置の表面にコーティングされている抗インフルエンザウイルス抗体と、検体中インフルエ

ンザウイルス抗原、標識インフルエンザウイルス抗体および基質との、サンドイッチ ELISA による複合体が形成されると、白色光にて青紫色に反射し、陽性と判定する。

2) 対象患者と検体

1999 年 2 月から 4 月の、日本鋼管病院小児科外来および入院の、インフルエンザ様疾患の患者を対象とした。生後 1 ヶ月から 15 歳まで(平均年齢 3.9 歳)の、外来患者 18 例、入院患者 57 例から、鼻咽頭吸引液あるいは咽頭スワブを採取し、FLU OIA およびウイルス分離を行った。また、流行状況から、A 型インフルエンザの症例が少なかったため、A 型インフルエンザが流行した 1998 年 1 月と 1999 年 1 月に採取した冷凍保存検体についても FLU OIA を検討した。

鼻咽頭吸引液は、トラップ付検体吸引容器を用いて鼻咽頭から分泌物を吸引し、1~2・の生理食塩水でカテーテルを洗うように希釈したものを検体として、添付の綿棒につけて FLU OIA を手順通り行った。咽頭スワブ検体の採取は、添付の綿棒で、咽頭を擦って FLU OIA 用の検体を採取した後、ウイルス分離用に別に咽頭スワブを採り、ウイルス輸送培地 1.5・中に撹拌した。FLU OIA は当日中に検査し、ウイルス分離用の、残りの鼻咽頭吸引液と咽頭ぬぐい液は、-80℃で冷凍保存した。

FLU OIA 検査の開始が、すでに B 型インフルエンザの流行期だったため、A 型インフルエンザウイルスについては、冷凍保存検体を加えて検討した。1998 年 1 月、1999 年 1 月の A 型インフルエンザの単独流行期に採取され、すでに Directigen FluA とウイルス分離が終了し、残りを -80℃に冷凍保存されていた検体を解凍して FLU OIA を実施した。

3) RT-PCR

一部の検体については、Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction

(RT-PCR)と患者ペア血清のインフルエンザウイルス赤血球凝集抑制(Hemagglutination Inhibition : HI) 試験を実施した。

C. 研究結果

1) 鼻咽頭吸引液についての検討

23 例の入院患者から 42 検体を採取した。ウイルス分離陽性は 10 検体 (H3N2 : 2、H1N1 : 1、B : 7) であった。ウイルス分離陽性 10 検体中、FLU OIA は 8 検体が陽性、2 検体が陰性。ウイルス分離陰性 32 検体中、FLU OIA は 22 検体が陰性で一致し、10 検体は陽性を示した。sensitivity は 80.0% (8/10)、specificity は 68.8% (22/32) であった。偽陽性 10 検体については、3 検体の症例で血清 HI 抗体価が 4 倍以上の上昇を認め、そのうち 1 検体は PCR 陽性 (A 型) であった。他の 7 検体は、2 例の入院患者から経時的に採取されたもので、PCR や種々の血清抗体検査とも陰性で、偽陽性となった原因は不明であった。

2) 咽頭スワブについての検討

外来と入院患者 57 例から 61 検体を採取した。ウイルス分離陽性は 30 検体 (H1N1 : 2、B : 28) であった。ウイルス分離陽性 30 検体中、FLU OIA は 11 検体が陽性、19 検体が陰性。ウイルス分離陰性 31 検体中、FLU OIA は 26 検体が陰性で一致し、5 検体は陽性を示した。sensitivity は 36.7% (11/30)、specificity は 83.9% (26/31) であった。

偽陽性 5 検体のうち、4 検体が PCR 陽性 (A : 1、B : 3) で、この結果で specificity を修正すると、96.3% (26/27) となった。

3) 冷凍保存検体による A 型インフルエンザウイルスについての検討

分離ウイルスは、すべて A (H3N2) である。鼻咽頭吸引液 48 検体については、ウイルス分離陽性 35 検体中、32 検体は FLU OIA も陽性で、ウイルス分離陰性 13 検体中、FLU

OIA は 12 検体が陰性で一致した。sensitivity は 91.4% (32/35)、specificity は 92.3% (12/13)であった。Directigen FluA との一致率は 87.0% (47/54) だった。

咽頭ぬぐい液は、0.1・を使用して、30 検体について検討し、ウイルス分離陽性 18 検体中、FLU OIA 陽性は 9 検体で、ウイルス分離陰性 12 検体中、11 検体が陰性で一致した。sensitivity は 50.0% (9/18)、specificity は 91.7% (11/12)であった。Directigen FluA との一致率は 59.4% (19/32) だった。

D. 考察

1998-99 年のインフルエンザの流行は、A 香港型の単独流行に近かった 1997-98 年と異なり、A 香港型、B 型が主流で、A ソ連型が散見される混合流行であった。同じ時期には RS ウイルス、ロタウイルスなども流行し、B 型インフルエンザについては、季節を外れた発生が見られる事もあるため、流行状況と臨床症状のみでインフルエンザを診断するのは、特に小児科領域では難しい。1999 年 1 月に発売された Directigen FluA は、A 型インフルエンザウイルスのみを検出するものである。B 型インフルエンザでも様々な合併症をおこし、入院になる事も多い小児科では、A 型も B 型も検出できるキットの有用性は特に高い。

FLU OIA は、A 型と B 型の区別はできないが、約 20 分で検査でき、試薬も 5 種類で手順は容易である。フィルターを使わないので、判定不能となることはほとんど無いが、弱陽性の場合には判定しにくいので、陽性コントロールで確認しておく事が必要である。

FLU OIA は、鼻咽頭吸引液では A 型も B 型も比較的安定した結果で、遠心分離、凍結融解した保存検体でも検査可能であった。咽頭スワブについては、添付書の記載でも他の検体より sensitivity が低いのが、添付書の 62.1% (18/29) と比較して、36.7% とさらに低い値

であった。その原因としては、入院患者が多く発症後日数が経過していた事が挙げられるが、偽陰性 19 検体のうち 11 検体は発症後 3 日以内に採取されたものであったので、必ずしもそう言えない点がある。

同じようにウイルスの核蛋白に対する抗体を用いた検査キット、Directigen FluA でも、鼻咽頭吸引液の方が感度、特異度とも高く、発症後長く陽性を示す傾向が見られているので、鼻咽頭吸引液が採取できる症例では、鼻咽頭吸引液で検査する方が望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Amantadine therapy for influenza type A-associated encephalopathy Sugaya N, Miura M Pediatric Infectious Disease Journal 18(8):734, 1999

Optical Immunoassay による A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの臨床的検討

三田村敬子、菅谷憲夫、清水英明、葦沢真理、高橋浩治、平位芳江、武内可尚
感染症誌 73 (10) : 1069-1073, 1999

鼻咽頭吸引液を検体とした Optical Immunoassay 法によるインフルエンザ迅速診断

山崎雅彦、木村和弘、渡辺寿美、込山修、御宿百合子、山本敬一、菅谷憲夫、橋本洋子、萩原紀子、前沢民子、今井光信
感染症誌 73 (10) : 1064-1068, 1999

Overview of influenza vaccine and antiviral drugs Sugaya N

Asian Medical Journal 42(6):285-290, 1999