

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** A/H3N2 ウイルスの HA は、1968 年には球状部に 2 本の糖鎖をもつただけであったが、1975 年には 3 本に、1986 年には 4 本にその数を増やしている。現在流行を起こしている A/H1N1 ウイルスや B 型ウイルスの HA も球状部に 4~5 本の糖鎖をもっている。糖鎖を獲得することにより効率よく抗体圧から逃れている可能性を疑わせる知見である。ところが A/H2N2 ウイルスの HA は、11 年間 (1957~68 年) の流行期間中、終始 169 位に 1 本の糖鎖をもつただけで、その数を増加させていない。先に我々は、抗 HA 単クローン抗体によって選択されたエスケープ変異株の解析から、HA 分子も 131 位、160 位もしくは 187 位のいずれかに糖鎖を獲得する潜在能力をもつことを明らかにした。本研究では、これらの 3 つの部位に 1~3 本の糖鎖を人為的に付加した HA 蛋白の性状を調べた結果、糖鎖の数の増加に伴って H2 分子のレセプター結合能は低下し、3 本が付加されるとほぼ完全にレセプター結合能を失うことが明らかになった。

#### A. 研究目的

A/H3N2 ウイルスでは、1968 年の出現当時には HA の球状部に 2 本の糖鎖をもつにすぎなかったが、1975 年には 3 本に、1986 年には 4 本にその数を増やしている。現在流行を引き起こしている A/H1N1 ウイルスや B 型ウイルスも、HA の球状部先端に 4~5 本の糖鎖をもっている。これらのウイルスが、球状部の糖鎖を増やすことによって、抗体圧 (antibody pressure) から逃れ得る変異体を効率よく産生している可能性を疑わせる事実である。先に我々は、A/H2N2 ウイルスの抗原構造を解析する過程で、このウイルスが、HA 分子の 131 位、160 位及び 187 位の 3 ケ所のいずれかに糖鎖を獲得することによって単クローン抗体抵抗性のエスケープ変異株を産生する能力を秘めていることを明らかにした。ところが、1957~68 年の A/H2N2 分離株 HA の球状部は、いずれも 169 位に 1 本の糖鎖をもつだけで、糖鎖の増加はいっさい起こっていない。この事実は、

A/H2N2 ウイルスでは、A/H1N1 や A/H3N2 ウイルスとは異なり、HA の球状部に新たな糖鎖を獲得することがウイルスの生存に不利に働く可能性を疑わせる。本研究では、以上の考察に基づき、以下の 2 点の解明を試みた。1) A/H2N2 ウイルスは、HA の 131 位、160 位、187 位に 2 本以上の糖鎖をもつウイルスを産生できるか。2) 上記の 3 ケ所に、1~3 本の糖鎖を人為的に付加すると、H2 分子の性状はどのように変化するか。

#### B. 研究方法

1. 131 位、160 位及び 187 位に 2 本以上の糖鎖をもつエスケープ変異株の分離の試み : H2 分子は 6 つの抗原領域をもつ (I-A~I-D、II-A 及び II-B)。抗原領域 I-A、I-B、I-C に対する単クローン抗体によって選択された多くのエスケープ変異株は、それぞれ 160 位、187 位及び 131 位に新しい糖鎖を獲得している。そこですでに 1 本の糖鎖を獲得している変異株を別の領域に対する抗体

存在下で増殖させることにより、さらに新たな糖鎖を獲得したエスケープ変異株の分離を試みた。

2. 131 位、160 位及び 187 位に 1~3 本の糖鎖をもつ HA 蛋白の発現：親株の HA cDNA に上記の変異を導入した上で、発現ベクター pME18S に組み込み、COS 細胞で発現させた。

3. 赤血球吸着試験：発現 COS 細胞を *Arthrobacter ureafaciens* 由来のノイラミニダーゼ (5 mU/ml) で前処理したのち、モルモット血球 (1%) もしくはニワトリ血球 (0.5%) を用いて吸着試験を行った。赤血球吸着の程度は、蒸留水処理後、OD<sub>540</sub> を測定することによって定量した。

### C. 研究結果

1. 131 位、160 位及び 187 位に 2 本の糖鎖を獲得したエスケープ変異株は採取不可能である。：1) 187 位に糖鎖をもつエスケープ変異株 (4/79-EM1、5/77-EM1) を I-C 領域に対する抗体存在下で増殖させることにより、187 位と 131 位に 2 本の糖鎖をもつウイルスの分離を試み、I-B と I-C 領域に対する抗体の双方との反応性を欠く 10 個の変異株を採取できた。ところがこのうちの 7 つは、159 位 (S→P)、193 位 (T→K)、227 位 (G→R) のいずれかに変異をもつものであり、残りの 3 つは、131 位 (T→K) もしくは 159 位 (S→L) の変異に加えて 187 位 (N→D) に変異を獲得することにより 187 位の糖鎖さえ失うもので、目的のウイルスは採取できなかった。A/カヤノ/57 株のストックウイルスを親として用い、I-C に対する抗体で選択して得られる 15 個の変異株のうち 13 個が 131 位に糖鎖をもつことを考慮に入れると、187 位と 131 位の双方に糖鎖をもつウイルスは分離不可能と判断される。2) 160 位に糖鎖をもつエスケープ変異株 (1/119-EM2) を I-B 領域に対する抗体存在下で増殖させ 160 位と 187 位に糖鎖をもつウイルスの分離を試みたが、採取できた 5 個の変異株は、いずれも 193 位 (T→K) に変異をもつものであり、187 位に糖鎖を獲得したものは存在しなかった。さらに 1/119-EM2 を I-C 領域に対する抗体存在下で増殖させ、160 位と 131 位に糖鎖をもつ変異株の採取

を試みたが、得られた 5 個の変異株は 135 位 (G→V) もしくは 193 位 (T→K) のいずれかに変異をもつものであった。

2. 131 位、160 位及び 187 位に 1~3 本の糖鎖をもつ変異 HA 蛋白の性状：131 位、160 位及び 187 位に 1 本、2 本もしくは 3 本の糖鎖をもつ合計 7 個の変異 HA 蛋白を COS 細胞で発現させ、その性状を 169 位だけに糖鎖をもつ野生型 (WT) HA と比較した。

1) 細胞内輸送能：各変異蛋白がゴルジ装置に輸送され得るか否かを明らかにするため、<sup>35</sup>S-メチオニンで 20 分パルスラベルした発現細胞を種々の時間チェイスした上で、免疫沈降により回収した HA のエンドグリコシダーゼ H (endoH) に対する感受性を調べた。その結果、1~2 本の糖鎖を獲得した変異体だけでなく、3 ヶ所のすべてに糖鎖を獲得した変異体でさえ WT と同じ速度で endoH に抵抗性を示すようになるのを認めた。さらに、<sup>35</sup>S-メチオニンで 20 分パルスしたのち 2 時間チェイスした発現細胞を TPCK-trypsin (5 µg/ml) で処理し、細胞表面に出現した HA の開裂を試みたところ、7 つのすべての変異 HA 蛋白が、WT と同程度に開裂を受けることが明らかになった。以上の結果から、3 つの部位のすべてに糖鎖が付加されてさえ、H2 分子の細胞内輸送能は影響を受けないと結論される。2) レセプター結合能：各変異蛋白を発現させた COS 細胞にモルモットもしくはニワトリ赤血球を用いて赤血球吸着試験を行い、以下の成績を得た。①131 位、160 位及び 187 位のいずれかに 1 本の糖鎖を獲得した蛋白を発現させた細胞には、モルモット血球は WT 発現細胞と同程度によく吸着した。ところがニワトリ血球の吸着能は明らかに低下しており、WT 発現細胞の 23~45% の血球しか吸着できなかった。これにより、1 本の糖鎖が付加された場合でも、HA のレセプター結合能は有意に低下すると結論される。②2 本の糖鎖を獲得した HA 蛋白の発現細胞の赤血球吸着能は、モルモット赤血球を用いた時でさえ WT 発現細胞の 20~25% に低下しており、ニワトリ赤血球を用いればその差はさらに広

がった (9~15%)。③HA が 3 本の糖鎖を獲得すると、ニワトリ血球だけでなくモルモット血球を吸着保持する活性もほぼ完全に失う。これらの結果と、131 位、160 位、187 位に 2 本の糖鎖を獲得したエスケープ変異株が採取できないという事実を考え併せると、糖鎖を獲得することに基づくレセプター結合能の低下が、H2 分子が球状部に糖鎖を増やせない大きな原因になっていると推測される。

#### D. 考察

現在分離されている A/H1N1 や A/H3N2 ウイルス並びに B 型ウイルスの HA は、球状部先端に 4~5 本の糖鎖をもっている。しかも少なくとも H3 では、年代と共にその数を増している。抗体圧から効率よく逃れるために糖鎖の数を増やしていると考えるのが妥当であろう。これに対して A/H2N2 ウイルスの HA は、11 年間の流行期間中、終始 169 位に 1 本の糖鎖をもつだけで、糖鎖の数を増やすことはなかった。H2 分子の場合には、糖鎖を増やせない原因があり、そのために抗体圧に対してアミノ酸置換だけで対応せざるをえず、これが同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た 1 つの原因になっている可能性が強いと考える。今回の研究により、糖鎖の付加は H2 分子のレセプター結合能に影響を及ぼし、131 位、160 位、187 位のうちの 2 ヶ所に糖鎖が付加されるとレセプター結合能は大きく低下し、3 ヶ所のすべてに導入されるとレセプター結合能をほぼ完全に失うことが明らかになった。A/H2N2 ウイルスが 2 本以上の糖鎖の付加に耐えられないのは、そのようなエスケープ変異株が分離不可能であるとの結果からも支持される。1 本の糖鎖が付加されたエスケープ変異株は容易に分離できるので、そのような変異株が自然界に出現しなかったのは別の原因によるかもしれない。しかしヒトの体内での増殖には、これらの変異株にみられる程度のレセプター結合能の低下さえ、不利に働く可能性も否定できない。

最近の A/H3N2 ウイルスはレセプター結合能が

低下しており、それとバランスを保つかのようにノイラミニダーゼ活性も低下しているという。A/H2N2 ウイルスの NA は、A/H3N2 ウイルスの NA の供給源なので、少なくとも 1968 年当時の A/H3N2 ウイルスと同程度の強い酵素活性をもっていたものと推測される。これが事実であれば、強いノイラミニダーゼ活性をもつ A/H2N2 ウイルスのレセプター結合能が僅かでも低下すれば、増殖能の低下に直結する可能性を否めない。

#### E. 結論

1957~68 年の流行期間中に、A/H2N2 ウイルスの HA が球状部に新たな糖鎖を獲得できなかった原因を調べ、以下の成績を得た。

1. H2 分子の 131 位、160 位、187 位のいずれかに 1 本の糖鎖を獲得したエスケープ変異株は容易に採取できる。しかし 2 ヶ所に糖鎖をもつ変異株を採取することは不可能である。

2. 1 本の糖鎖を獲得した HA 蛋白のレセプター結合能は僅かに低下するにとどまるが、2 本の糖鎖を獲得するとレセプター結合能は著しく減弱し、3 本の糖鎖を獲得するとレセプター結合能をほぼ完全に失う。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Kimura, H., Sugawara, K., Tsuchiya, E., Suzuki, H., Hongo, S., and Nakamura, K. (2000). Characterization of antigenically unique influenza C virus strains isolated in Yamagata and Sendai cities, Japan, during 1992-1993. *J Gen Virol.* 81, 1447-1452.

2) Alamgir, A.S.M., Matsuzaki, Y., Hongo, S., Tsuchiya, E., Sugawara, K., Muraki, Y., and Nakamura, K. (2000). Phylogenetic analysis of influenza C virus nonstructural (NS) protein genes and identification of the NS2 protein. *J Gen Virol.* 81, 1933-1940.

3) Li, Z-N., Hongo, S., Sugawara, K., Sugahara, K., Tsuchiya, E., Matsuzaki, Y., and Nakamura, K. (2001).

The sites for fatty acylation, phosphorylation and intermolecular disulphide bond formation of influenza C virus CM2 protein. *J Gen Virol.* in press.

2. 学会発表

1) 松寄葉子、菅原勘悦、土屋恵美、本郷誠治、中村喜代人、水田克巳、鈴木宏 遺伝的再集合体によるC型インフルエンザの流行 第48回 日本ウイルス学会学術集会 津 平成12年10月.

2) 菅原一彦、本郷誠治、李柱男、菅原勘悦、土屋恵美、松寄葉子、中村喜代人 C型インフルエンザウイルス HE 蛋白の抗原性と細胞内輸送におよぼす個々の糖鎖の影響 第48回 日本ウイルス学会学術集会 津 平成12年10月.

3) 李柱男、本郷誠治、菅原一彦、菅原勘悦、松寄葉子、土屋恵美、中村喜代人 C型インフルエンザウイルス CM2 蛋白の翻訳後修飾 第48回 日本ウイルス学会学術集会 津 平成12年10月.

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

サーベイランスに基づく分子疫学、新型インフルエンザの危機管理行動に関する研究

分担研究者 小田切 孝人 国立感染症研究所ウイルス第1部呼吸器系ウイルス室長

研究要旨

次シーズンのインフルエンザワクチン株の選定にとって、国内外のインフルエンザサーベイランス情報やウイルス株の入手、分与は不可欠な作業である。本研究事業では、情報の入手発信部門とウイルス株の入手、分与および解析部門の整備と機能的な共同研究体制が構築された。また、新型ウイルスの出現をいち早く捉えるために、ヒトのみならずトリ、ブタなど動物からのウイルス分離および定期的な抗体保有状況の調査検討を行った。さらに、新型ウイルスの出現に備えて、速やかにワクチン製造株を供給できるように、全ての亜型のウイルス株の収集とそれら高増殖株の作成、保存作業が開始された。

共同研究者

西藤 岳彦、板村 繁之、斉藤 利憲、渡辺 真治、今井 正樹（国立感染症研究所ウイルス第1部呼吸器系ウイルス室）

松永 泰子、山下 和予、新藤 奈邦子、岡部 信彦（国立感染症研究所情報センター）

鈴木 宏（新潟大学医学部公衆衛生学教室教授）

柏木 征三郎（国立病院九州医療センター院長）

全国都道府県、政令指定都市衛生研究所

一方、インフルエンザの感染防御にとって不可欠なインフルエンザワクチンにおいては、採用されるウイルス株の的確な選定が決定的な重要作業になる。これには、次シーズンの流行をより正確に予測するためのグローバルな情報収集システムの確立と国内外からのスムーズな分離株の入手、交換システムの確立が必要である。

本研究では、これら諸問題に対応し、新型ウイルス出現時により適格に対応できる危機管理システムの確立、およびより感染防御効果の高い流行株に一致したワクチン株選択のための系統的なサーベイランスシステムの構築を目的としている。

A. 研究目的

A/香港型（H3）ウイルスおよびA/ソ連型（H1）ウイルスがヒトの世界に出現してから、既に20～30数年が経過しており、これまでのインフルエンザの歴史から見て、いつ新型ウイルスが出現しても不思議ではない状況にある。1997年に香港で起こったトリの強毒株 H5N1 が中間宿主のブタを経ることなくヒトに直接感染して、感染者の6人（30%）を死に至らしめた出来事は、これまで経験したことのない新型ウイルスの出現形態であったことや、家禽のみならずヒトに対しても強い病原性を示したことなどから、多くのインフルエンザ関係者を緊張させた。幸運にもヒトからヒトへの感染の拡大はなかったが、この出来事は新型ウイルス出現時に迅速に対応できる危機管理体制を確立しておくための課題と多くの問題点を提起した。

B. 研究方法

1. インフルエンザ流行情報および分離株の入手。

全国各地の定点から報告される患者発生動向およびウイルス分離数などの情報は、国立感染症研究所（感染研）情報センターの WISH-Net から入手した。

2. 分離株の抗原解析および遺伝子解析。

全国各地の地方衛生研究所（地衛研）から報告される分離株の約10%に相当する株を取り寄せた。これらを ferret 感染標準抗血清を用いて、さらに詳細な抗原解析を行った。また、分離株の

HA 遺伝子配列を決定して、系統樹を作成した。

3. H1～H15 亜型インフルエンザウイルスの系統保存。

トリ由来の新型ウイルス出現対策として、全亜型のトリウイルスを系統的に収集保存した。また、各亜型の代表的な株に対するヤギ抗血清を作成した。

4. ブタにおける新型ウイルスの検出および抗体検出の試み。

新型ウイルスが中間宿主のブタの世界に侵入しているのか否かを監視するために、全国の地衛研に依頼して、ブタでのウイルス分離およびブタ血清中の H1, H5, H9 ウイルスに対する抗体調査を定期的に行った。

5. インフルエンザワクチン接種後の抗体応答の解析。

ワクチン接種後の免疫応答を検討するために、成人層および老人層からワクチン接種前後のペア血清を採取し、ワクチン株および流行株に対する交叉免疫応答を調べた。

## C. 研究結果

1. インフルエンザ様患者発生情報、ウイルス分離数および分離株の入手システムの確立。

インフルエンザ様患者発生動向およびウイルス分離数などの情報は、WISH-Net をとおして感染研情報センターに集めるというシステムが数年前から開始されていた。一方、同研究所呼吸器ウイルス室では、個別に FAX によりこれらの情報を地衛研から入手し、それに応じて分離株を取り寄せて抗原解析を行っていた。このように、同一の研究所に異なる二系統の情報収集システムが存在することから生じる情報の食い違いなどの混乱がたびたび生じるなど、解決すべき問題点が浮き彫りになってきた。そこで、感染症法（感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律）が施行され、定点観測点が 3000 から 5000 に増えたことなどを契機にして、インフルエンザの情報収集システムを WISH-Net に一本化し、さらに WISH-Net へのデータ入力システムの大幅な改善を行った。これによって、分離ウイルスとそれらの抗原解析情報とを一致させることが可能になり、より正確な流行状況の把握ができるようになった。さらに、改良を加えた WISH-Net によって、全国各地での分離状

況や感染研での抗原解析結果などの情報を各地衛研へ適時に還元することができるようになった。

2. 分離株の抗原解析および遺伝子解析。

平成 12 年度（1999/2000）シーズンでは、全国で 8220 株のウイルスが分離され、亜型による分離比率では A/ソ連型が 62%、A/香港型が 37% であった。B 型ウイルスの流行はなかったが、14 株が分離された。感染研では、これら分離株の約 10% にあたるウイルスを各地方衛研から入手して、亜型間における詳細な抗原解析および赤血球凝集素（HA）遺伝子の系統樹解析を行った。その結果、A/ソ連型においては前年度および今年度のワクチン株である A/北京/262/95、A/NewCaledonia/20/99 に類似した株が流行の大半を占めていたことが分かった。しかし、抗原的にも遺伝的にも全く異なるグループに入る A/Bayern/7/95 類似株も少数ながら分離された。一方、A/香港型では A/Sydney/5/97 が流行の主流であったが、抗原的に少し変化した今年度のワクチン株 A/Panama/2007/99 類似株も増えてきたことが分かった。B 型ウイルスでは、ワクチン株の B/山梨/166/98 とは抗原的にも遺伝的にも大きく変化した B/四川/379/99 類似株が分離株の大半を占めることが分かった。これらの解析結果の詳細は、病原微生物検出情報（IRSA、12 月号）および感染研情報センター Home page に掲載し、全国への情報還元を行った。また、これらの結果は 9 月にクレタ島で開催された WHO インフルエンザワクチン推奨株選定会議で報告された。

インフルエンザワクチン株の選定にあたっては、国内の情報に加えて、諸外国における流行状況を適格に捉える必要がある。このために我々は、各 WHO インフルエンザ協力センター（WHO Flu-CC）間で頻繁に流行情報の交換をし、さらに、国内での分離株および分離株に対するフェレット感染抗血清などを随時交換して、ワクチン製造株として最も適当な株を選択するための共同研究システムを確立した。平成 12 年度では、WHO Flu-CC および中国から約 100 株を超える分離株を入手して、それらの抗原解析と遺伝子解析を行った。その結果、諸外国における分離株の性状は、国内株の性状とほぼ同じ傾向であることが分かった。これらの成績は、2001

年南半球、2002年北半球のためのWHO、インフルエンザワクチン推奨株選定会議で報告された。

### 3. ワクチン接種後の抗体応答の解析。

流行株の抗原性が頻繁に変化するインフルエンザウイルスにおいては、それに伴ってワクチン株の変更を適宜行う必要が生じてくる。我々は、流行ウイルス株の抗原変化を解析した情報のみならず、ワクチン接種後に得られる抗体がどの程度の変異株まで対応しうるのかを解析して、次シーズンのワクチン株の変更の必要性を血清学的な視点からも検討した。これには、ワクチン接種前後のペア血清を成人層（平均年齢34歳）28名および老人層（平均年齢81歳）30名からそれぞれ採取し、ワクチン株、A/ソ連型ウイルス（H1）、A/香港型ウイルス（H3）およびB型ウイルスの流行株に対するHI抗体価を測定した。その結果、いずれの年齢層もワクチン株であるA/Panama/2007/99（H3N2）、A/New Caledonia/20/99（H1N1）に対して高いHI抗体価を示すこと、さらに、多少抗原性がずれた流行株に対しても高い交叉HI反応を示すことなどが分かった。このことは、これらワクチン株は良好な免疫原性をもち、その免疫はある程度の変異株に対しても有効であることを示唆している。すなわち、次シーズンも今シーズンと類似したウイルス株が流行する限り、ワクチン株を変更する必要がないことが示された。一方、B型ワクチンであるB/山梨/166/98株では、どの年齢層に対しても低い抗体価しか得られず、流行株に対してもほとんど反応しなかった。このことから、次シーズンにむけては、B型ワクチン株の変更の必要性が示唆された。

### 4. ブタへのトリ型（H5、H9）ウイルスの侵入監視体制。

1997年のH5N1および1999年のH9N2のヒトへの感染例を除いて、トリのインフルエンザウイルスに起源を発する新型ウイルスの多くは、中間宿主であるブタを経由してヒトの世界へ侵入してくると考えられている。特に、H9N2は強毒株H5N1の内部蛋白遺伝子のドナーと考えられており、哺乳動物に広く伝播できる能力をもつことが分かってきた。このことは、H9N2が新型ウイルス出現時の遺伝子供給源となりうることを示唆しており、ヒトおよびブタの世界への侵

入の有無をH5N1とともに注意深く監視警戒する必要がある。そこで我々は、我が国のブタがH5N1、H9N2に感染しているのか否かを監視するために、全国28地区の地衛研の協力のもとに2230頭のブタから血清を採取して、A/duck/Singapore/3/97（H5N3）、A/turkey/Wisconsin/66（H9N2）およびA/New Jersey/1/76（H1N1）に対する抗体保有調査を実施した。その結果、注視すべきH5、H9ウイルスに対する抗体はいずれも陰性であり、現在の所これらウイルスは日本のブタの集団には侵入していません。この調査は、今後も継続して行っていく必要がある。

### 5. 新型ウイルス出現時におけるワクチン製造株供給体制の確立。

1997年のH5N1発生時には、我が国ではそれによるPandemic対策として、リバースジェネティクス法により弱毒化したH5遺伝子をトリウイルスに導入した不活化ワクチンを試作した。現行のワクチン製造行程では、一定量のワクチン供給までには5～6カ月を要するが、Pandemic発生時にはより迅速なワクチン供給が要求される。これに対応するために我々は、どの亜型の新型ウイルスが出現しても速やかにワクチン製造株を供給できるように、全ての亜型のトリウイルスを系統的に保存した。現在、それらを瞬化鶏卵で継代して、卵で良く増える高増殖株の作成にとりかかっている。一方、どの亜型のウイルスが出現したのかを迅速に捉えることができるように、H1～H15までの代表的なウイルスに対するヤギ抗血清を作成した。現在、これら抗血清の亜型間の交叉反応の有無を検討しており、診断キットとして必要時に全国に配布できるように準備を進めている。

### D. 考察

インフルエンザサーベイランスは、次シーズンの流行予測とワクチン株の選定にとって不可欠である。より精度の高い流行予測を行い、流行株にマッチしたワクチン株を選択するためには、自国の流行状況を把握するのみならず、諸外国との共同研究のもとに外国での流行状況なども分析したグローバルな視点でサーベイランスを進めていかなければならない。本研究事

業では、患者発生状況やウイルス分離状況、さらには地衛研における分離株の初期解析結果などの情報収集システムを再整備して、より一体化したシステムの構築を行った。従って、これまで同一研究所から異なる情報が発信されるといふ混乱は今後は起こらないものと思われる。

また、中国を含む WHO Flu-CC 間でウイルス株や抗体、流行状況などの情報交換を円滑に行う共同研究体制もでき、新型ウイルスの出現などを速やかに捉えることも可能であると考えている。

新型ウイルスの出現に対しては、それと抗原性が類似した弱毒株を用いて、速やかにワクチン製造にとりかかれる準備をしておかなければならない。どのようなウイルスが新型としてヒトの世界へ侵入してくるかは不明であるが、解決策のひとつとして、全ての亜型をそろえたウイルスバンクの整備とそれらを識別するための抗体の準備が必須である。本研究では、この方針にそって、15亜型全てのウイルスとそれに対する抗体の作成が完了した。しかし、ワクチン製造には、孵化鶏卵で高増殖する株が必要であり、その準備を急がねばならない。また、トリ由来のウイルスを用いて作成したワクチンが、ヒトにとって十分な免疫原性をもつとは限らない。今後は、これらの問題点を考慮しつつ、ワクチンの形態および投与方法なども検討して行かねばならない。

## E. 研究発表

### 1 論文発表

Obuchi, M., Yamamoto, J., Odagiri, T., Uddin, M. N., Iizuka, H., and Ohara, Y. (2000) L\* Protein of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Is Required for Virus Growth in a Murine Macrophage-Like Cell Line. *J. Virol.* 74, 4898-4901

小田切 孝人 (2000)。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

小田切 孝人 (2000)。インフルエンザワクチンの新展開。Medical Briefs in Virus Infection 13, 4-5, 2000.

小田切 孝人 (2000)。B型インフルエンザウ

イルス 小児診療 63, 2039-2043

小田切 孝人 (2000)。臨床医のためのインフルエンザウイルス学 診断と治療 88, 1-6

Odagiri, T., Kariwa, H., and Ohara, Y. (in press) The influenza B virus BM2 protein is involved in the ribonucleoprotein complexes through the binding with membrane protein M1. In "Options for the Control of Influenza IV." (eds.) A.D.M.E. Osterhaus et al., Elsevier Science, Amsterdam.

Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, Tashiro M : Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J Gen. Virol.* 81: 2503-2510 (2000).

Hiromoto Y, Saito T, Lindstrom S, Nerome K: Characterization of low virulent strains of highly pathogenic A/Hong Kong/156/97 (H5N1) virus in mice after passage in embryonated hens' eggs. *Virology* 272:429-437 (2000).

Hiromoto Y, Yamazaki Y, Fukushima T, Saito T, Lindstrom SE, Omoe K, Nerome R, Lim W, Sugita S, Nerome K: Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *J Gen Virol.* 81: 1293-1303 (2000).

Hiromoto Y, Saito T, Lindstrom SE, Li Y, Nerome R, Sugita S, Shinjoh M,

Nerome K: Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus. *J Gen Virol.* 81:929-937 (2000).

Saito T. and Yamaguchi I. : Effect of Glycosylation and Glucose Trimming Inhibitors on the Influenza A Virus Glycoproteins *J. of Veterinary Medical Science* 62(6):575-581 (2000)

Saito T., Tashiro M. : Vaccine and therapeutics against influenza virus

*Pediatric International* 42 (2) 219-225(2000)

### 2.学会発表

T. Odagiri, H. Kariwa, and Y. Ohara. A possible role of the influenza B virus BM2 protein in production of the infectious particles. 11<sup>th</sup> International Conference on Negative Strand Viruses, Quebec City, June (2000)

T. Odagiri, H. Kariwa, and Y. Ohara. The BM2



protein of influenza B virus is a necessary component for production of the infectious virions. Options for the Control of Influenza IV, Crete, Greece, September (2000)

S. E. Lindstrom, Y. Hiromoto, N. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, K. Nerome. Comparative analysis of the evolutionary patterns of the HA and six internal genes of human influenza B virus Options for the control of influenza IV, Crete, Greece, September (2000)

Y. Horomoto, T. Saito, S. Limdstrom, K. Nerome Isolation and characterization of low virulent variants of highly pathogenic A/Hong Kong/156/97 (H5N1) virus in mice following passage in embryonated hen's eggs. Options for the control of influenza IV, Crete, Greece, September (2000)

S. Itamura, H. Nishimura, E. Emani, K. Enami, A. Takada, H. Ozaki, H. Tanaka, K. Okazaki, H. Kida, T. Iwasaki, T. Kurata, H. Aizaki, Y. Matsuura, T. Miyamura, K. Takeuchi, K. Tanabayashi, T. Saito, K. Omoe, K. Nerome, S. Yamasaki, M. Tashiro. Genetically engineered influenza A virus as a vaccine strain for highly viulurent H5N1 viruses isolated from human. Options for the control of influenza IV, Crete, Greece, September (2000)

T. Saito, W. Lim, H. Kida, M. Tashiro Characterization of a human H9N2 virus isolated in Hong Kong in 1999 Options for the control of influenza IV, Crete, Greece, September (2000)

小田切 孝人、苅和 宏明、大原義朗。インフルエンザBウイルスBM2蛋白の機能。第48回日本ウイルス学会総会、2000年10月 三重県津市

板村繁之・西村秀一・西藤岳彦・田代真人・堀内清 新型インフルエンザ(A/H5N1)に対するワクチンの試験製造と安全性評価 第48回日本ウイルス学会総会 2000年10月、三重県津市

西藤岳彦・喜田宏・田代真人 1999年に香港で人から分離されたH9N2型インフルエンザウイルスの性状 第48回日本ウイルス学会総会 2000年10月、三重県津市

#### F. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得および実用新案登録

なし

# アマンタジン耐性インフルエンザウイルスの分子疫学的研究

分担研究者： 鈴木 宏 (新潟大学医学部公衆衛生)

共同研究者： 斎藤 玲子、押谷 仁 (新潟大学医学部公衆衛生)

増田 寛樹 (新潟大学医学部付属病院薬剤部)

**研究要旨** 抗ウイルス剤、アマンタジン(Am)は A 型インフルエンザ感染症の予防・治療に有効であり、服用後容易に耐性株が出現する特徴を有する。1998 年本邦で A 型インフルエンザへの適応追加後、使用量は内科・小児科領域で爆発的に増加しており、耐性株増加が危惧されている。我々は PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)法及び TCID<sub>50</sub> 法を用い高齢者と小児における Am 使用と耐性株出現について検討した。

1) 8 高齢者施設 (1998/99 年シーズン) のインフルエンザ患者 141 件の RT-PCR 陽性中、34 件(24.1%)が耐性株であり、うち Am 内服者は 6 件(17.6%)と少数のみであった。主に抗インフルエンザ剤として用いた 4 施設と抗パーキンソン剤としてのみ用いた 4 施設での耐性株出現頻度は有意差を認めず、耐性株のみの施設内流行は見られなかった。

2) 6 小児科医院 (1999/2000 年シーズン) を症状出現 48 時間以内に受診したインフルエンザ迅速診断陽性患児 200 名中、160 名に Am 投与 (40 名非投与群) したところ、投与群では 19.2%に副作用をみとめ、再診時以降の検体では 24 / 81 件(29.6%)に Am 耐性株が出現した。Am 治療群では非投与群に比して 3 日目まで有意に解熱したが、耐性化群では 5 日目に熱の再上昇が見られた(p<0.05)。

以上、本研究より高齢者および小児では高頻度に Am 耐性株が出現し、特に小児では副作用の頻度も高く耐性群で熱の再燃傾向もみられることから Am の慎重な投与とモニタリングシステムの充実が望まれる。

## A. 研究目的

インフルエンザウイルスは冬季に増加する超過死亡の主な病因であり、しかも新興感染症としての新型インフルエンザの近い将来の到来も懸念される。基本対策はワクチン接種であるが、効果の限界として迅速性に問題があり、抗ウイルス剤の役割は大きい。アマンタジン(Am)は抗 A 型インフルエンザ剤として治療・予防に有効であるが、諸外国の文献では服用後約 1 / 3 の患者に耐性株が出現するとされる。アマンタジン耐性株は、インフルエンザウイルスの第 7 分節 M2 蛋白にコードされるイオンチャンネル膜通過部位内面の 26、27、30、31 番アミノ酸に相当

するコドンの 1 塩基置換によって生じる。

本邦では 1998 年末に抗 A 型インフルエンザ剤として適応追加後、1998/99 年度は 132 万人分 (100mg/day×5 日)、1999/2000 年度は 213 万人分とほぼ毎年倍量が使用された。このような無秩序な使用は、これまでにない耐性株の大量発生とその伝播が危惧されその分子疫学的研究とインフルエンザ予防・治療対策への影響を早急に検討する必要がある。

本研究では PCR-RFLP 法を用い、1) 高齢者施設における Am の使用状況及び耐性株出現頻度、2) 小児科外来での Am の副作用、治療効果および耐性株出現頻度について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

#### a. 高齢者施設

1998/99年シーズン中、新潟県内8高齢者施設入所者のインフルエンザ様疾患患者から採取した咽頭ぬぐい液246件を検査対象とした。施設内でのインフルエンザ流行状況、患者のアマンタジンの使用状況についても調査した。

#### b. 小児外来

1999/2000年シーズン中、新潟市近郊の6小児科病院を、発症48時間以内に受診したA型インフルエンザ様疾患罹患児で、インフルエンザ迅速診断法(Directigen™ Flu A, 日本ベクトンディッキンソン)によりA型インフルエンザ感染が確認された200名を対象とした。同意の得られた160名に、アマンタジンを3日間、5mg/kg/日(最大100mg/日)を投与し、非投与群40名とあわせ家人に体温測定記録を依頼した。3日ごとの外来通院とし、診察毎に咽頭ぬぐい液を採取、副作用の有無と両群の熱型の観察を行った。

### 2) 実験室的方法

#### a. PCR-RFLP法

患者咽頭ぬぐい液100μからRNAを抽出し、逆転写反応後、共通のFirst PCR産物から、Am耐性株の3種類のアミノ酸変異(27, 30, 31位)に対応するnested PCRを行い、3種類の異なる制限酵素(BspLuII I, Hha I, Sca I)で処理し電気泳動の多型性により耐性株と感受性株の判定を行った。耐性株はすべてM2蛋白膜追加部位のシークエンスを行いアミノ酸変異を確認した。

#### b. TCID<sub>50</sub>法

それぞれの調査で採取された咽頭ぬぐい液は、MDCK細胞に接種しマイクロプレート法によりウイルス分離同定を行うと共に、96穴のマイクロプレートに2.0μg/mlアマンタジン入りと無しの希釈列を作りTCID<sub>50</sub>法による力価差で耐性の判定を行うAm感受性試験で表現型の確認を

行った。

## C. 研究結果

### a. 高齢者施設

1998/99年シーズン、新潟県内8高齢者施設の246件のインフルエンザ様疾患患者咽頭ぬぐい液より、PCR陽性141検体をPCR-RFLP法にて検討し、34件(24.1%)の耐性株を検出した。アミノ酸変異部位別には、31番耐性株(Ser-31-Asn)31件(91.2%)、30番耐性株(Ala-30-Thr)3件(8.8%)、27番0件であった。

インフルエンザの治療としてアマンタジンの内服後に耐性株が確認された者は6名(耐性株中17.6%)のみであった。全8施設中、アマンタジンを主に抗インフルエンザ剤として用いた4施設(うち2施設では抗パーキンソン剤としても使用)においては、98件中27件(27.6%)の耐性株出現をみとめた。一方、抗パーキンソン病および抗脳梗塞後遺症のみに使用した施設4施設においても耐性株の出現頻度は43件中7件(16.3%)と高かった。しかし、これらの抗インフルエンザ剤として使用した施設と非使用施設における耐性株出現頻度には統計的な有意差を認めなかった。

施設毎に耐性株頻度を経時的に検討し、抗インフルエンザ剤として使用した1施設では、2回の流行のうち1回目の1月の流行は耐性株が見られ、2回目の3月の流行には耐性株は検出されなかった。他の6施設においても、インフルエンザの流行度やAmの投与患者数は異なっていたが、耐性株のみの流行は見られなかった。

Am投与後に耐性株が出現した6名の患者について耐性株出現までの日数を検討し、うち4名は投与2日目以降に耐性株が出現していた。2名の患者で第0日でも耐性株が出現しており、耐性株の施設内感染例であると考えられた。

### b. 小児科外来

1999/2000年シーズン中、新潟市近郊の6小児科病院を受診し、迅速診断法で確認されたイ

インフルエンザ患児 200 名中、Am 投与群 160 名、投与群 40 名について検討した。

Am 投与時の副作用頻度は、156 名中、30 名 (19.2%) で、不穏 14 名 (9.0%)、ふらつき 7 名 (4.5%)、不眠 5 名 (3.2%) など中枢神経症状が薬剤副作用の特徴と思われた。年齢別検討で頻度に差は見られなかった。

PCR-RFLP 法を用い、アマンタジン投与後の再診時 81 例中 24 例 (29.6%) が耐性株と判定された。アミノ酸変異部位別には、31 番耐性株 (Ser-31-Asn) 16 件 (66.7%)、30 番耐性株 (Ala-30-Thr) 3 件 (12.5%)、27 番 5 件 (20.8%) であった。

治療効果では、アマンタジン投与群は第 2、第 3 病日にほぼ平熱に戻り、非投与群に比べて早い解熱傾向がみられたが、耐性群では第 5 病日に有意な熱の再上昇がみられた ( $p < 0.05$ )。臨床的にインフルエンザでは二峰性発熱がしばしばみられ、耐性群 30%、感受性群 9.2%、非投与群 12.5% と、耐性群に二峰性発熱を多く認めた。

#### D. 考察

本邦ではアマンタジンは 1975 年より抗パーキンソン病治療薬として主に高齢者に投与されてきたが、1998 年末、抗 A 型インフルエンザ治療剤として認可され、処方数が急増しており耐性株増加が危惧されている。欧米では、インフルエンザ治療患者の 1/3 に耐性株が出現し、家族内感染や、施設内感染も報告されている。Am 耐性株は M2 蛋白膜通過部位アミノ酸の 1 塩基置換により生じるとされ、諸外国における耐性株のスクリーニングは分離ウイルス株からの ELISA 法や、M2 蛋白部分のシーケンスが一般的である。我々は Am 感受性試験としてウイルス培養を使った TCID<sub>50</sub> 法を用いており、さらに PCR-RFLP 法を開発し、細胞培養を経ずに咽頭ぬぐい液から 27, 30, 31 番変異耐性株が最短 7~8 時間でより簡便に検出することが可能になった。

高齢者施設における PCR-RFLP 法を用いた Am 耐性株は 141 件中 34 件 (%) と高頻度であり、抗インフルエンザ剤として使用した施設と抗パ

ーキンソン病剤として使用した施設でも統計学的に有意差なく、ほぼ同様に耐性株が存在することが示された。これらの事実からパーキンソン病にアマンタジンが使用されている施設では、インフルエンザウイルスの施設内への暴露があれば耐性株が容易に出現し、耐性株の感染力および病原性は感受性株とほぼ同等とされることから、高齢者施設という易感染者が密に接する場所で、伝播が起きやすいと考えられた。

小児科において、アマンタジン投与後の副作用は 19% であり、成人での約 13% との報告に比べやや多いと思われた。副作用は可逆的で、出現した際は投与の中断で症状はすみやかに消失するが、今後添付文書、小児への安全性も含め考慮が必要と考えられた。

患者咽頭ぬぐい液からは再受診時に 29.6% と高率に耐性株が検出され、投与者の約 1/3 とされる欧米での報告と一致していた。また、投与後のアマンタジン耐性株出現時期は 3 日目以降で、高齢者及びこれまでの報告同様、アマンタジンの投与後 48~72 時間で容易に耐性株が出現することが示された。

アマンタジン治療効果としてすみやかな解熱効果がみられ、有用と考えられたが、第 5 病日にアマンタジン耐性群に熱の再上昇を認め、文献的にも耐性株での病状の再燃傾向を示す報告もあり、今後症例数を増やして検討を加える必要があると思われた。

#### E. 結語

新潟県内高齢者施設及び小児科外来にて A 型インフルエンザに対するアマンタジン使用を検討したが、高齢者施設では施設内感染もあり Am 耐性株が高頻度に検出され、小児では副作用の多さと耐性化群での熱の再燃傾向が示され、今後も慎重な投与が望まれた。また、コミュニティでの Am 耐性株増加も危惧され幅広いサーベイランスシステムの確立が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Masuda, H., Suzuki, H., Oshitani, H., Saito R., Kawasaki K., Nishikawa, M., Satoh, H. Incidence of amantadine-resistant influenza A viruses in sentinel surveillance sites and nursing homes in Niigata, Japan. *Microbiol. Immunol.* 2000; 44: 833-839.
2. 斎藤玲子、増田寛樹、押谷 仁、鈴木 宏、川崎 聡、佐藤 博. 新潟県内高齢者施設における A 型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株(Ser-31-Asn 遺伝子型, genotype) 出現頻度. *感染症学会誌.* 2000; 74: 646-652.
3. 佐藤 勇、斎藤玲子、佐野康子、笹崎義博、佐藤雅久、庄司義興、常山佐世子、坂井貴胤、増田寛樹、押谷 仁、鈴木 宏. A 型インフルエンザ感染に対するアマンタジン治療の検討. *外来小児科.* 2000; 3: 255-259.

### 2. 学会発表

1. Saito, R. Oshitani, H., Suzuki, H., Masuda, H., Satoh H.. Incidence of amantadine-resistant influenza A in sentinel surveillance sites and nursing homes in Niigata, Japan. 4<sup>th</sup> annual meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program. 2000. Feb. 24-25<sup>th</sup>. San Antonio.
2. 佐藤 勇、佐野康子、笹崎義博、佐藤雅久、庄司義興、常山佐世子、斎藤玲子、鈴木宏. A 型インフルエンザ感染に対するアマンタジン治療の検討. 第 10 回日本外来小児科学会年次集会. 2000 年 8 月 26 日. 大宮.
3. 斎藤玲子、増田寛樹、押谷 仁、坂井高胤、鈴木 宏、佐藤 博. 新潟県内高齢者施設における A 型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株出現頻度. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会・総会. 2000 年 10 月 12-14 日. 津.
4. 斎藤玲子、佐藤 勇、増田寛樹、坂井貴胤、押谷 仁、鈴木 宏. 小児 A 型インフルエン

ザ感染に対するアマンタジン治療の検討、特に耐性株に注目して. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会・総会. 2000 年 10 月 12-14 日. 津.

5. Saito, R., Oshitani, H., Suzuki, H. Emergence of resistant strains in Japan. 5<sup>th</sup> annual meeting, US- Japan Cooperative Medical Science Program. 2001. Jan. 24-26<sup>th</sup>. Okinawa.

遺伝子組換えによるインフルエンザウイルスの弱毒化とワクチン株の開発に関する研究

分担研究者 榎並 正芳 金沢大学医学部助教授

インフルエンザウイルスA型の遺伝子組換え技術RNaseH法を用いて、151残基からなるNS1と外来遺伝子との融合蛋白を発現する遺伝子組換えウイルスを作成した。当該ウイルスを培養細胞とモデル実験動物としてマウスを用いて、ウイルス複製、遺伝子発現、病原性、免疫原性、弱毒化機構を解析した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの遺伝子組換え技術を利用して、1) ウイルスの病原性を規定するウイルス因子と宿主因子を明らかにする、2) ウイルスの弱毒化の機構を明らかにし、弱毒ワクチン株としての利用を検討する。3) 種々の抗原を発現するウイルスを迅速に作成する系を開発する。ウイルス因子として今年度はNS1に絞った。培養細胞レベルと実験動物レベルで、ウイルス複製と遺伝子発現、病理学的、免疫学的解析を行う。

B. 研究方法

インフルエンザウイルスA型の遺伝子組換えはRNaseH法（Enami & Enami, 2000）を用いた。NS2ACATウイルスのNSゲノムは、NS1のN端側151残基の下流に自己切断活性を持つ17残基の2Aプロテアーゼ配列を挟んでCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子を挿入し作成した。培養細胞はMDBK細胞を用いた。動物実験は、BALB/cマウスを用い経鼻摂取で行った。

C. 研究結果

遺伝子組換えにより、NS1のC端半分を削除し110残基からなるNS1を発現するウイルスを作成した。当該ウイルスは、ウイルス感染の初期過程は正常であるが、後期蛋白の発現とウイルス粒子形性が抑制され、マウスに対し100倍程度弱毒化されたが免疫原性を保持していた。次にNS1遺伝子の1/3を異種遺伝子で置き換えたNS2ACATウイルスを作成した。当該ウイルスは、培養細胞レベルではNS1とCATの融合蛋白を発現した後、その20%は直ちに自己切断され成熟型蛋白となった。感染24時間後には発現CAT蛋白の50%が培養上精中に検出された。当該ウイルスは、温度感受性となり、マウスに対して高度に弱毒化された。マウス肺ではウイルスの僅かな複製とCATの発現が確認され、血中IgG抗体価の僅かな上昇が見られた。当該ウイルス感染マウスは、致死量のWSNウイルス感染に対し完全に感染防御がみられた。マウスから分離したTリンパ球と

精製CAT蛋白を用いたin vitroの解析では、 $\gamma$ インターフェロンの誘導、CTL活性が確認された。

D. 考察

当該ウイルスの弱毒化の機構は、ウイルス粒子形成の抑制による。今後は、1) 遺伝子組み換えに用いるウイルスのHAの抗原性を変えて多重摂取可能な系を作成する必要がある、2) NS1と相互作用する宿主因子の解析を行う必要がある、3) ウイルス因子としてHA、NA、NPの解析も行う予定である。

E. 結論

インフルエンザウイルスA型のNS1と異種遺伝子融合蛋白を発現する遺伝子組換えウイルスは、当該インフルエンザウイルスに加えて種々の抗原性に対する弱毒ワクチン株として有効であると思われる。

F. 研究発表

論文発表

Enami, M., and Enami, K. Characterization of influenza virus NS1 mutants using a novel helper-virus-free reverse genetics system. *J. Virol.* 74, 5556-5561, 2000.

榎並正芳。インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス。Medical Briefs in Virus Infection 13, 12-13, 2000.

Enami, M., Kuroda, K., Kawashima, S., Enami, K., and Watanabe, Y. Influenza Virus NS Genome as a Vector. Submitted for publication.

Naomi, T., Enami, M., Kuroda, K., Itamura, S., and Takemori, T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. Submitted for publication.

G. 知的所有権の取得状況

なし

## インフルエンザウイルス感染症の迅速診断、Directigen Flu A+B 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 インフルエンザの A 型、B 型が鑑別可能な迅速診断キット、Directigen Flu A+B (Becton Dickinson 社、米国) について検討した。インフルエンザ様疾患患者 239 例を対象として、検体は鼻咽頭吸引液を用いた。ウイルス分離陽性は 128 検体で (A 型 H1N1 77 例、A 型 H3N2 51 例)、陰性は 111 検体であった。Directigen Flu A+B 陽性は 120 検体、陰性は 119 検体で、ウイルス分離と比較すると、感度 89.8%、特異度 95.5% であった。本キットとディレクトィジェン Flu A (日本ベクトンディッキンソン社) との比較では、陽性と陰性の判定は 97.9% (234/239) が一致した。B 型インフルエンザは、凍結保存した鼻咽頭吸引液 60 検体を用いた。本キットはウイルス分離と比較して、感度 88.9%、特異度 88.1% であった。インフルエンザ OIA (第一化学薬品) との比較では、陽性と陰性の判定は 91.7% (55/60) が一致した。Directigen Flu A+B は、鼻咽頭吸引液では、従来のキットと同等の感度、特異度、迅速性を示し、さらに、A 型と B 型のウイルスを区別して検出できることから、抗インフルエンザ薬の投与に際しての判断基準として有用である。

### A. 研究目的

インフルエンザの治療薬として、1998 年からアマンタジンが A 型インフルエンザに対する適応を認められ、2001 年 2 月からはノイラミニダーゼ阻害剤も保険適応が認められた。インフルエンザも治療可能な疾患となったために、インフルエンザ迅速診断の必要性、重要性は従来に比べて一段と高まっている。1999 年に発売された A 型インフルエンザ迅速診断キットにより、リアルタイムの診断が可能となり、診療面にも大きな変化をもたらした。次いで A、B 型インフルエンザウイルス検出キットが発売されたが、A 型、B 型をまとめて検出するもので、区別することはできない。

今回、酵素抗体法 (EIA) を用い、A 型、B 型を区別して検出することができる、インフ

ルエンザ迅速診断キット Directigen Flu A+B (Becton Dickinson 社、米国) を、インフルエンザシーズンに使用し、ウイルス分離、PCR、他の迅速診断キットと比較検討した。

### B. 研究方法

2000 年 1 月から 3 月に、インフルエンザ様症状で受診した、外来および入院患者、を対象に、鼻咽頭吸引液 239 検体を採取した。採取した検体は迅速診断を実施後、残りをウイルス分離に使用した。分離されたインフルエンザウイルスは、全て A 型であったため、B 型インフルエンザに対する検討は、1999 年 2 月から 4 月に採取した鼻咽頭吸引液 60 検体を用いて行った。

比較試験として、ウイルス分離、nested RT-PCR、および既に発売されているインフ

ルエンザウイルス迅速診断キットを検査した。ウイルス分離は MDCK 細胞を用いた。キットとウイルス分離の結果が不一致の検体は、nested RT-PCR を実施した。他のインフルエンザウイルス迅速診断キットとの比較は、A型インフルエンザについては、ディレクティジェン Flu A (日本ベクトン・ディッキンソン社) と、B型インフルエンザについては、インフルエンザ OIA (第一化学薬品) と実施した。

Directigen Flu A+B は、ディレクティジェン Flu A と同じ原理の、膜フィルターを用いた EIA によるインフルエンザ迅速診断キットで、A 型、B 型それぞれのインフルエンザウイルス核蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて、2 つの反応面で別々に A 型、B 型を検出する。

本キットは、カラーパックと呼ばれる反応ディスクと、8 種類の試薬で構成されている。操作手順は、検体 200  $\mu$ l に抽出液を加え攪拌した液をフィルターで濾過し、カラーパックの 2 つの反応面(well)にそれぞれ 4 滴ずつ分注する。フローコントローラーをはずし、洗浄後、上側の well に A 型、下側の well に B 型の検出試薬 (モノクローナル抗体) をそれぞれ滴下し、2 分間放置する。その後洗浄液 2 種類と基質を滴下し、5 分後に停止液を加えて判定する。全手順は 10 分程度で行うことができる。陽性の場合には、反応面に紫色の三角形を認め、陰性の場合には、中心部にコントロールのドットのみとなる。

### C. 研究結果

迅速診断キットを、検体採取直後に凍結することなく判定した 127 検体 (以下新鮮検体) と、一度凍結融解後判定した 112 検体 (以下凍結検体) の合計 239 検体について、あわせて検討した。ウイルス分離陽性は 128 検体、ウイルス分離陰性は 111 検体であった。分離ウイルスは、すべて A 型インフルエンザウイルスで、A ソ連型が 77 株、香港型が 51 株であった。

Directigen Flu A+B とウイルス分離と比較すると、感度 89.8% (115/128)、特異度 95.5% (106/111)、陽性反応的中率 95.8% (115/120)、陰性反応的中率 89.1% (106/119) となった。亜型別の感度は、A ソ連型が 87.0% (67/77)、A 香港型が 94.1% (48/51) となり、有意差は認められなかった。

ウイルス分離陰性、本キット陽性の 5 検体は、PCR では陽性となり、この結果で修正すると、感度 90.2% (120/133)、特異度 100% (106/106)、陽性反応的中率 100% (120/120)、陰性反応的中率 89.1% (106/119) となった。

同じ検体のディレクティジェン Flu A の成績は、感度 92.2% (118/128)、特異度 95.5% (106/111) であった。ウイルス分離陽性検体はディレクティジェン Flu A の方が 3 例多く陽性を示したため感度は高い値となったが、両キットの陽性と陰性の判定は 97.9% (234/239) が一致した。

新鮮検体 127 検体については、衛研で凍結融解した後再度判定した。2 施設における判定の不一致はウイルス分離陽性の 4 検体のみ



られ、病院のみが陽性と判定した検体が3検体、衛研のみが陽性と判定した検体が1検体で、96.9% (123/127) の判定結果が一致した。

B型インフルエンザについての検討を行った冷凍検体は、ウイルス分離でB型インフルエンザウイルス陽性は18検体、分離陰性は42検体であった。ウイルス分離陽性18検体中、本キットも陽性は16検体で、感度88.9%、ウイルス分離陰性42検体中、本キットも陰性だったのは37検体で、特異度88.1%であった。ウイルス分離陰性、本キット陽性の5検体は、PCRでは陽性を示し、この結果で修正すると感度90.2% (120/133)、特異度100% (106/106) となった。

同じ検体のインフルエンザ OIA の成績は、ウイルス分離と比較して感度83.3% (15/18)、特異度83.3% (35/42) で、Directigen Flu A+Bとは91.7% (55/60) の結果が一致した。

#### D. 考察

我が国でのインフルエンザの流行は、1998/1999 シーズンの前半はA香港型インフルエンザ、後半はB型インフルエンザが主に流行し、1999/2000 シーズンはA香港型とAソ連型の混合流行であった。インフルエンザは、年毎に流行型が変化するが、最近ではB型インフルエンザが定期的に流行する傾向がみられている。小児では、B型インフルエンザも、A香港型インフルエンザと同程度に重要で、入院となることも少なくないため、A型、B型両方のインフルエンザが

検出できる迅速検出キットの必要性はより高い。しかし現在使用されているキットは、A型、B型を同時に検出するもので区別することはできない。

現在、国内では、インフルエンザ迅速診断キットとして、A型インフルエンザに対するディレクティジェン Flu A と、A型、B型を同時に検出するインフルエンザ OIA が市販されている。今回の成績では、ディレクティジェン Flu A 陽性でも、Directigen Flu A+B が陰性だったものが、239検体中5検体みられたが、2つのキットの一致率は97.9%と高く、両者の感度に有意差は認められなかった。また、インフルエンザ OIA と Directigen Flu A+B の比較では、感度、特異度とも Directigen<sup>TM</sup> Flu A+B のほうが若干高い数値であったが、検定の結果、有意とはいえないものであった。用いた検体は凍結融解後の、B型インフルエンザのみであったため、A型インフルエンザも含む新鮮検体を用いた再検討が必要である。

以上の結果から、Directigen Flu A+B、鼻咽頭吸引液の使用では、感度、特異度とも高く、特にPCRを加えた結果では特異度100%となることから、偽陽性が非常に少ないことが示された。また、各亜型の検討では、ウイルス分離と比較した感度は、A香港型が94.1%、Aソ連型が87.0%、B型が88.9%で、鼻咽頭吸引液を用いれば、A型、B型いずれのインフルエンザに対する感度も同等である。

#### E. 結論

インフルエンザの治療については、アマンタジンに加えて、ノイラミニダーゼ阻害剤も最近保険適応となった。Directigen Flu A+B は型別の検出が可能なために、抗ウイルス剤の選択に有効である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sugaya N. Influenza-associated encephalopathy in Japan: pathogenesis and treatment. *Pediatr Int* 2000;42(2):215-8.

Shinjo M, Bamba M, Jozaki K, Takahashi E, Koinuma G, Sugaya N. Influenza type A-associated Encephalopathy with Bilateral Thalamic Necrosis in Japan. *Clin Infect Dis* 2000;31(2):611-3.

木村和弘、込山修、山崎雅彦、山本敬一、菅谷憲夫. 小児の A 型インフルエンザ感染症治療でのアマンタジン血清濃度. *感染症誌* 2000 ; 74 ( 9 ) : 699-702.

山崎雅彦、木村和弘、三田村敬子、菅谷憲夫、他. インフルエンザウイルス A、B 型を区別して検出可能な迅速診断キットの臨床的検討. *感染症誌* 2000 ; 74 ( 12 ) : 1032-7.

清水英明、渡辺寿美、川上千春、菅谷憲夫、他. A 型、B 型を鑑別できるインフルエンザウイルス迅速診断キットの感度と特異性. *感染症誌* 2000 ; 74 ( 12 ) : 1038-43.

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

モノクロナール抗体による新型インフルエンザの予防と治療

分担研究者 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長

研究要旨：これまでの研究で、A/Okuda/57 株(H2N2)を免疫して得られたモノクロナール抗体、C179 は、A 型インフルエンザウイルスの H1 と H2 亜型を例外なく中和することを明らかにしてきた。また、マウスに C179 を投与すると、致死量の A/FM/1/47 株 (H1N1) の感染に対して、予防および治療効果を認めた。今回の研究では、トリインフルエンザウイルス H4~H15 亜型も加え、A 型のすべての亜型に対する C179 の反応性を調べた。C179 は、調べたすべての H1、H2、H5、H9 のウイルスを中和した。さらにマウスを用いた感染実験で、C179 はマウス感染実験系の確立していない H9 を除いて、H1、H2、H5 亜型の肺内での増殖を抑制した。C179 は、新型インフルエンザとして出現する可能性の高い H2、H5、H9 に対し、予防、治療において有用な抗体と考えられた。

A. 研究目的

新型インフルエンザの予防にはワクチン、治療には抗インフルエンザ薬が考えられるが、大流行が起こった場合には十分に機能しない可能性がある。これらを相補する候補としては、新型インフルエンザウイルスを中和する抗体があり、これらは予防、治療の両方に使える長所がある。これまでの研究で、モノクロナール抗体、C179 は、A 型インフルエンザウイルスの H1 と H2 亜型をすべて中和することを証明した。しかし、A 型インフルエンザウイルスには H1~H15 の亜型があり、どの型が新型インフルエンザとして出現するのかわからない。今回の研究では、それら亜型に対する C179 の反応性について、in vitro と in vivo の系で調べた。

B. 研究方法

ウイルス：本研究で用いたヒト及びトリのインフルエンザウイルス株は以下の通りである。ヒト型：A/FM/1/47(H1N1)、A/PR/8/34(H1N1)、A/Bangkok/10/83(H1N1)、A/Yamagata/120/83(H1N1)、A/Osaka/930/88(H1N1)、A/Suita/1/89(H1N1)、A/Okuda/57(H2N2)、A/Adachi/2/57(H2N2)、A/Kumamoto/1/65(H2N2)、A/Kaizuka/2/65(H2N2)、A/Izumi/5/65(H2N2)、A/Aichi/2/68(H3N2)、A/Fukuoka/C29/85(H3N2)、A/Ibaraki/1/90(H3N2)、トリ型：

A/Budgreiger/Aichi/1/77(H3N8)、  
A/Duck/Czechoslovakia/1/56(H4N6)、  
A/Turkey/Ontario/7732/66(H5N9)、  
A/Duck/Hong Kong/342/78(H5N2)、  
A/Duck/Hong Kong/820/80(H5N3)、A/Whistling  
swan/Shimane/476/83(H5N3)、  
A/Shearwater/Australia/1/72(H6N5)、A/Tufted  
duck/Shimane/124R/80(H7N7)、  
A/Turkey/Ontario/6118/68(H8N4)、  
A/Turkey/Wisconsin/66(H9N2)、A/Duck/Hong  
Kong/448/78(H9N2)、A/Duck/Hong  
Kong/702/95(H9N5)、  
A/Chicken/Germany/N/49(H10N7)、  
A/Duck/England/56(H11N6)、  
A/Duck/Alberta/60/76(H12N5)、  
A/Gull/Maryland/704/77(H13N6)、  
A/Mallard/Astrakhan/263/82(H14N5)、  
A/Duck/Australia/341/83(H15N8)

これらの孵化鶏卵は尿膜腔にて培養し、採取した  
糞尿液を-80℃にて保存した。

モノクロナール抗体：A/Okuda/57(H2N2)をマウスに免疫して得られたモノクロナール抗体、C179 のハイブリドーマ細胞をマウス腹腔内に接種し、採取した腹水よりプロテイン A にて精製した IgG 溶液 (10.5mg/ml) を以下の実験に用いた。

染色試験：抗体の染色価は、Peroxidase anti-peroxidase (PAP)法により行った (Okuno, Y. et al., J. Clin. Microbiol. 38:389-417, 1990)。96

穴マイクロプレートにて培養したウイルス感染細胞に PBS にて 4 倍階段希釈した精製抗体を 50  $\mu$ /well ずつ添加し、37°C で 60 分間反応させた後、抗マウス IgG ウサギ抗体、抗ウサギ IgG ヤギ抗体、PAP complex を順次反応させた。最後に 0.01 %  $H_2O_2$  を含む 0.3mg/ml の 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を室温で 10 分間反応させてウイルス感染細胞を染色し、顕微鏡にて感染細胞を観察した。

中和試験：抗体のウイルス中和活性は、PAP 染色を応用したフォーカス計数法にて測定した (Okuno, Y. et al., J. Clin. Microbiol. 38:389-417, 1990)。4 倍階段希釈した精製抗体に、50~80 Focus forming unit (FFU) に調整したウイルス液を等量ずつ添加し、37°C で 60 分間反応させた後、96 穴マイクロプレートに培養した MDCK 細胞に 25  $\mu$ l/ml ずつ接種した。37°C で 60 分間吸着した後、最終濃度 2  $\mu$ g/ml になるよう Acetylated Trypsin を添加した血清不含 MEM 培地を添加し、37°C の  $CO_2$  孵卵器にて 24 時間培養した。これをエタノール固定した後、感染細胞を PAP 法で染色し、フォーカスを計数した。

免疫沈降反応：免疫沈降反応は Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit (ベリンガー) を用いて行い、Western blot 法にてバンドの有無を確認した。ウイルスを感染させた MDCK 細胞の細胞膜を RIPA buffer で破壊して蛋白をビオチン化し、これに抗体を反応させた後にプロテイン A を添加して沈降させ、沈降した蛋白を SDS-ポリアクリルアミドゲルによって電気泳動した後にニトロセルロース膜にブロットし、アビジン-POD (peroxidase)、POD の基質溶液を反応させてバンドを発色させ、抗体に反応した蛋白を検出した。

マウス感染実験：マウスにおける感染阻止実験は、1 群 2 匹の 4 週齢の雌 Balb/c マウスに、1 匹あたり 1mg の C179 を腹腔内投与し、24 時間後に  $10^4$ ~ $10^6$  FFU のウイルス液を経鼻感染させた後、経時的に肺を採取し、ウイルス定量を行うまで -80°C で凍結保存した。これらを融解して PBS を 1ml 添加してホモジナイズし、フォーカス計数法にて肺のウイルスを定量した (Okuno, Y. et al., J. Virol. 68:517-520, 1994)。本実験に用いた各亜型ウイルス株は、A/FM/1/47(H1N1)、A/Okuda/57(H2N2)、A/GZ×PR8(H3N2)であった。

ウイルス遺伝子解析：GeneBank に登録されている株については、その遺伝子配列を引用した (GeneBank accession numbers D13570~D13584、M25283、M30122、D92303~D92307、M21647、M26090、M35996)。その他の株については、ウイルス感染細胞より AGPC 法でウイルス RNA を抽出し、A 型インフルエンザウイルスの HA 蛋白特異的プライマーおよび逆転写酵素 RAV-2 を用いて cDNA を合成し、PCR 法により cDNA を増幅させた。これをダイレクトシーケンシングして塩基配列を求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物実験指針に従い、動物に無用な苦痛を与えないように配慮して適正に行った。

### C. 研究結果

C179 の生物学的性状：A 型インフルエンザウイルスの H1~H15 に対する C179 の染色試験および中和試験を行った (Table 1)。C179 は、調べた H1、H2、H5、H9 すべての株に対し、染色および中和活性を示した。その他の亜型に対しては、染色活性、中和活性ともに認められなかった。

染色および中和活性を示した H1、H2、H5、H9、およびいずれの活性も示さなかった H3 に対する C179 の中和カイネティクスを調べた (Fig. 1)。H3 に対しては中和活性が認められなかったが、H1、H5、H9 に対しては H2 と比較して若干弱い、ほぼ同程度の中和活性を示した。

C179 がウイルスのどの蛋白を認識するのかを調べるため、免疫沈降反応を行った (Fig. 2)。C179 は、染色活性、中和活性ともに認められた H1、H2、H5、H9 の赤血球凝集素 (HA) に反応することが確認された (Fig. 2, lane 1、2、5、9)。その他の亜型に対しては、反応性は認められなかった (Fig. 2, lane 3、4、6、7、8、10、11)。

マウスにおける感染実験：マウス 1 匹あたり 1mg の C179 を腹腔内に投与し、24 時間後にウイルスを経鼻感染させた後、経時的に採取した肺のウイルス量を測定した (Fig. 3)。H1、H2、H5 を感染させたマウスにおいて、C179 投与群ではコントロールの PBS 投与群と比較して、肺におけるウイルス量が顕著に減少していた (Fig. 3, a、c)。一方、H3 を感染させたマウスにおいては、C179 投与群とコントロール群の間の肺内ウイルス量に有意差はなかった。