

C179 の認識部位のアミノ酸配列: C179 の反応性には、HA 幹部中間部の立体構造を形成している HA1 サブユニットの 318~322 アミノ酸領域 (A 領域) と HA2 サブユニットの 47~58 アミノ酸領域 (B 領域) が関与することを明らかにしていた (Okuno, Y. et al., J. Virol. 67:2552-2558, 1993)。これらの領域は、調べた H1 と H2 すべての株において保存されていた。そこで、H4~H14 における A と B 領域におけるアミノ酸配列も調べた (Table 2)。C179 が中和活性を示した H5 の 2 株のうち、A/Turkey/Ontario/7732/66 では A 領域に 1 か所、また両 H5 において B 領域に 1 か所にアミノ酸置換が認められた。H1、H2、H5、H9 以外の亜型については、A 領域に 1~2 か所、B 領域に 2~7 か所のアミノ酸置換が認められた。

D. 考察

モノクローナル抗体、C179 は、A 型インフルエンザウイルス H2 亜型を免疫して得られた抗体にもかかわらず、H2 のみならず H1 のウイルスに対して中和活性を示した (Okuno, Y. et al., J. Virol. 67:2552-2558, 1993)。今回の研究では、現在、自然界で存在が確認されているすべての HA 亜型 (H1~H15) の代表株について C179 の反応性を調べた (Table 1)。C179 は、H1、H2、H5、H9 に対して染色活性、中和活性を示した。C179 の中和活性の程度は、H2 に対しても H1、H5、H9 に対してもほとんど差がなかった (Fig. 1)。免疫沈降反応において、C179 は H1、H2、H5、H9 の HA を認識することが証明された (Fig. 2)。

致死量の A/FM/1/47(H1N1)をマウスに感染させた実験では、ウイルス感染の 24 時間前、あるいはウイルス感染 48 時間後に C179 を投与した場合でも、コントロールと比較すると低下していたもののマウスの肺でウイルス増殖は認められた (Okuno, Y. et al., J. Virol. 68:517-520, 1994)。しかし、C179 を投与した方が肺におけるウイルスの消失が早かった。本実験においても、C179 投与群ではウイルス感染後に肺でウイルスは増殖しているものの、コントロール群と比較して C179 投与群では A/FM/1/47(H1N1)でウイルス感染後 5 日以降、A/Okuda/57(H2N2) と A/Whistling swan/476/83(H5N2)でウイルス感染後 3 日以降の肺におけるウイルス量が顕著に減少していた (Fig. 3)。この傾向は、C179 をマウ

ス 1 匹あたり 100 μ g 投与した場合でも同様であった。これらの現象は、C179 によってウイルスの増殖は完全には阻止されないが、肺内でのウイルスの拡がりや抑制され、結果としてウイルスの消失が促進されると考えられた。また、C179 の中和活性が認められた H9 に関しても、H1、H2、H5 と同様にマウスにおいて C179 のウイルス増殖抑制効果を示すことが予測された。

中和抵抗性変異株の遺伝子解析から、C179 は HA 幹部の中間部を構造認識することを明らかにしてきた (Okuno, Y. et al., J. Virol. 67:2552-2558, 1993)。特に、HA1 の 318 番目と HA2 の 52 番目のアミノ酸が C179 の認識に重要であると証明した。ところが今回、多くの亜型のアミノ酸シーケンスを比較した結果、必ずしもこれらアミノ酸だけで C179 の認識部位を特定できるものではないことがわかった。部位特異的変異導入法などの手法を用いて、認識部位を特定する必要があると考えている。

1995 年、H5N1 のトリのインフルエンザウイルスに感染した住民 18 名が入院し、6 名が死亡するという事件が香港で発生した。さらに 1999 年、香港においてインフルエンザ様疾患で入院した 2 人の小児から H9N2 のウイルスが分離された。中国南部の住民の血清中には、H5 や H9 などのトリのインフルエンザウイルスに対する抗体が存在することが以前より知られていた。以上の事実より、次の新型インフルエンザの流行は、H5 か H9 の可能性が高いと考えられている。また、数十年前に流行した H2 が、新型インフルエンザとして出現することも十分にありえる。H1、H2、H5、H9 のウイルスを共通に中和する C179 は、これらのウイルスによる新型インフルエンザが出現した際、予防あるいは治療に有用であると考えられる。現在、マウスの抗体である C179 を人型化して、人への投与を可能にするための研究を進めている。

E. 結論

モノクローナル抗体、C179 は A 型インフルエンザウイルスの H1、H2、H5、H9 亜型を共通に中和し、マウスの感染実験で肺内でのウイルス増殖阻止効果を証明した。これらの亜型は新型インフルエンザとして流行を起こす可能性が高く、C179 は予防、治療に有用と考えられた。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., and Okuno, Y. Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. J. Clin. Microbiol. 38:3467-3469. 2000.
2. 奥野良信：インフルエンザワクチンの現況。医学のあゆみ、192：1186-1187、2000
3. 森島恒雄、富樫武弘、横田俊平、奥野良信、宮崎千明、田代真人、岡部信彦、葛西 健：インフルエンザに合併する脳炎・脳症に関する全国調査。日本医事新報、3953：26-28、2000
4. 奥野良信：新型インフルエンザウイルスによる大流行とその対策。Makoto (別冊)、111：1-7、2000
5. 奥野良信：インフルエンザワクチンの製造と課題。日本胸部臨床、59(9)：645-652、2000
6. 奥野良信：最新のインフルエンザウイルス診断法－疫学調査の立場から－。小児科診療、63(12)：2089-2092、2000
7. 奥野良信：地方衛生研究所のインフルエンザへの関わり (分担執筆)。インフルエンザのすべて－その臨床の最前線－(岡部信彦編)、p.44-47、新興医学出版社。2000

(2) 学会発表

1. 森川佐依子、前田章子、加瀬哲男、奥野良信、馬場宏一：乳幼児におけるインフルエンザ感染－臨床像と中和抗体との関連－。第15回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡県三島市 (2000. 4)
2. 森川佐依子、前田章子、加瀬哲男、奥野良信：乳幼児におけるインフルエンザの臨床像と中和抗体との関連。第41回日本臨床ウイルス学会、広島 (2000. 5)
3. 大西美幸、岡石幸也、岩田知子、佐伯集一、奥野良信、森本茂人、大西利夫、萩原俊男：高齢者におけるインフルエンザワクチンの有効性と抗体価測定 of 臨床的意義の検討。第42回日本老年医学会学術集会、仙台 (2000. 6)
4. 馬場宏一、前田章子、森川佐依子、加瀬哲男、奥野良信、上田重晴：1999/2000年インフルエンザ流行期 (門真市) におけるウイルス分

離状況－ワクチン群と非ワクチン群の比較。第48回日本ウイルス学会総会、三重県津市 (2000. 10)

5. 奥野寿臣、馬場宏一、森川佐依子、前田章子、奥野良信：乳幼児におけるインフルエンザ不活化ワクチン噴霧接種法の検討。第48回日本ウイルス学会総会、三重県津市 (2000. 10)
6. 森島恒雄、富樫武弘、横田俊平、奥野良信、宮崎千明、岡部信彦、田代真人：インフルエンザ脳炎・脳症全国調査結果 (厚生省インフルエンザ脳炎・脳症研究班)。第48回日本ウイルス学会総会、三重県津市 (2000. 10)
7. 中川直子、久保田律子、中川俊正、奥野良信：B型インフルエンザウイルス Victoria タイプの中和エピトープの解析。第48回日本ウイルス学会総会、三重県津市 (2000. 10)
8. 多屋馨子、宮川広実、天羽清子、指原淳志、廣田 努、前田章子、奥野良信、山西弘一、岡田伸太郎：小児におけるインフルエンザワクチン有効性に関する検討 (1999/2000 シーズン)。第4回日本ワクチン学会学術集会、横浜市 (2000. 11)

Table 1. Biological activity of C179 measured by neutralization and staining test

Virus strains		Neutralization test	Staining test
H1N1	A/PR/8/34	+	+
	A/FM/1/47	+	+
	A/Bangkok/10/83	+	+
	A/Yamagata/120/83	+	+
	A/Osaka/930/88	+	+
	A/Suita/1/89	+	+
H2N2	A/Okuda/57	+	+
	A/Adachi/2/57	+	+
	A/Kumamoto/1/65	+	+
	A/Kaizuka/2/65	+	+
	A/Izumi/5/65	+	+
H3N2	A/Aichi/2/68	—	—
	A/Fukuoka/C29/85	—	—
	A/Ibaraki/1/90	—	—
H3N8	A/Budgreiger/Aichi/1/77	—	—
H4N6	A/Duck/Czechoslovakia/1/56	—	—
H5N9	A/Turkey/Ontario/7732/66	+	+
H5N2	A/Duck/Hong Kong/342/78	+	+
H5N3	A/Duck/Hong Kong/820/80	+	+
H5N3	A/Whistling swan/Shimane/476/83	+	+
H6N5	A/Shearwater/Australia/1/72	—	—
H7N7	A/Tufted duck/Shimane/124R/80	—	—
H8N4	A/Turkey/Ontario/6118/68	—	—
H9N2	A/Turkey/Wisconsin/66	+	+
H9N2	A/Duck/Hong Kong/448/78	+	+
H9N5	A/Duck/Hong Kong/702/95	+	+
H10N7	A/Chicken/Germany/N/49	—	—
H11N6	A/Duck/England/56	—	—
H12N5	A/Duck/Alberta/60/76	—	—
H13N6	A/Gull/Maryland/704/77	—	—
H14N5	A/Mallard/Astrakhan/263/82	—	—
H15N8	A/Duck/Australia/341/83	—	—

Table 2. Comparison of amino acid sequences of A and B regions forming the conformational epitope in the HA stem region

Viruses	Amino acid positions	
	A region 318-322 in HA1	B region 47-58 in HA2
A/FM/1/47(H1N1)	T G L R N	G I T N K V N S V I E K
A/Okuda/57(H2N2)
A/Turkey/Ontario/7732/66(H5N9)	. . P I . . .
A/Whistling swan/Shimane/476/83(H5N3) I . . .
A/Tuekey/Wisconsin/66(H9N2)	V	K . . S . . . N I . D .
A/Aichi/2/68(H3N2)	. . M . .	Q . N G . L . R
A/Duck/Czechoslovakia/1/56(H4N6)	. . M . .	Q . N G . L . R L . . .
A/Sheawater/Australia/1/72(H6N5) I . D .
A/Turkey/Ontario/6118/68(H8N4)	V . M . .	K . . S . . . N . . D .
A/Chicken/Germany/N/49(H10N7)	. . M . .	Q . N G . L . R L . . .
A/Duck/England/1/56(H11N6)	. . P . .	Q . . S . . . N I V D R
A/Duck/Alberta?60/76(H12N5)	I M . .	N M Q . . L . N . . D .
A/Gull/Maryland/704/77(H13N6)	. . M . .	Q . . T . I . N I . D .
A/Mallard/Gurjev/263/82(H14N)	. . M . .	Q . N G . L . R L . . .

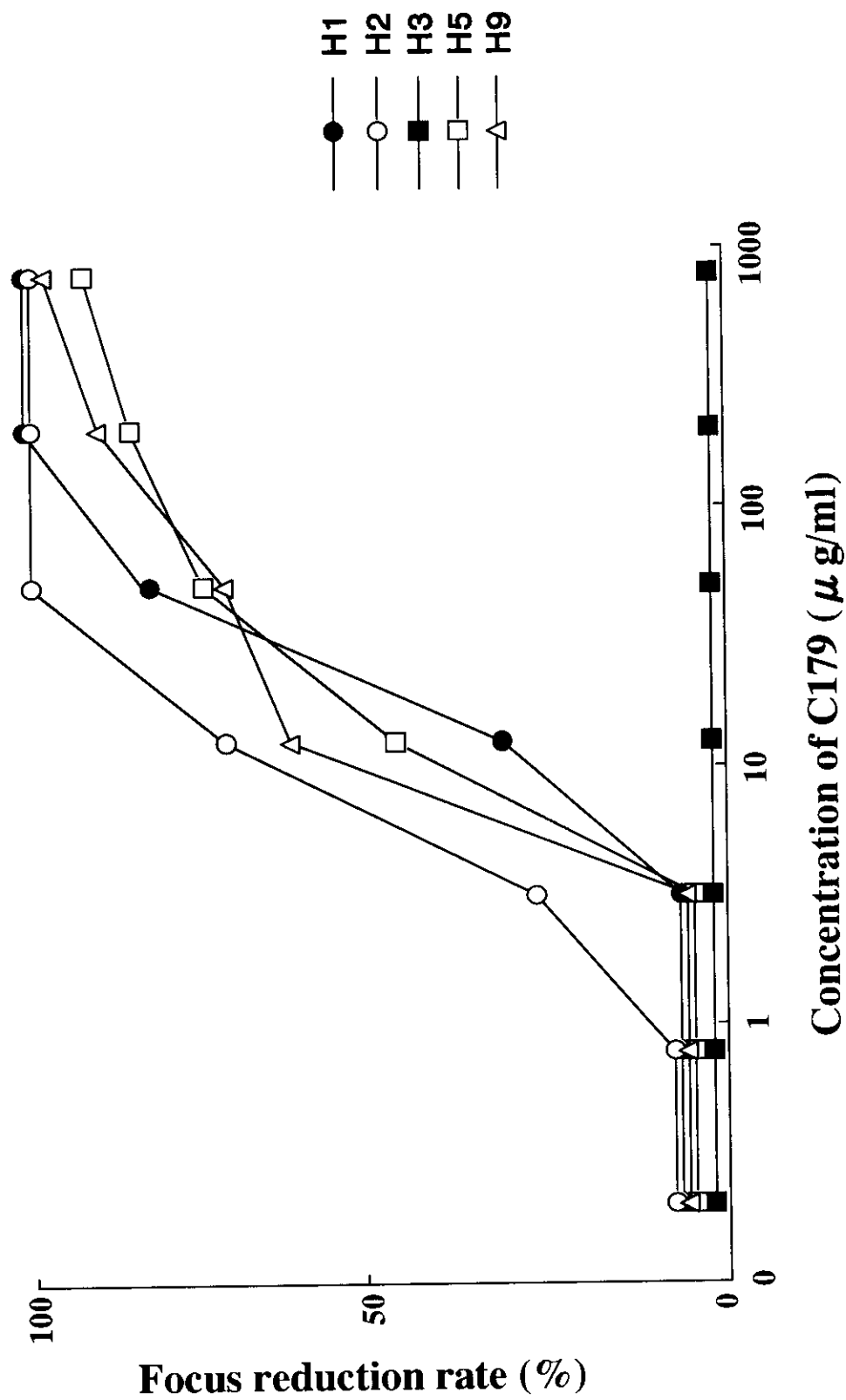


Figure 1. Kinetics of neutralizing activity of C179

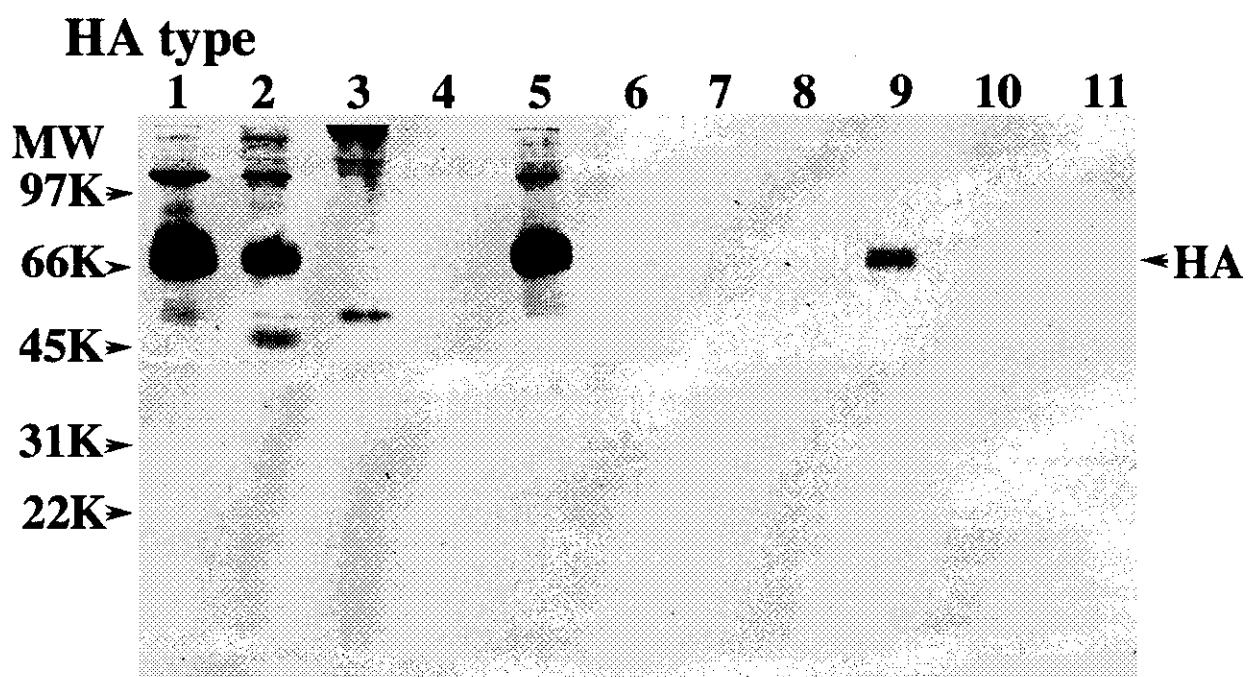


Figure 2. Demonstration that C179 reacts with the HA protein of H1, H2, H5 and H9 strains by immunoprecipitation assays

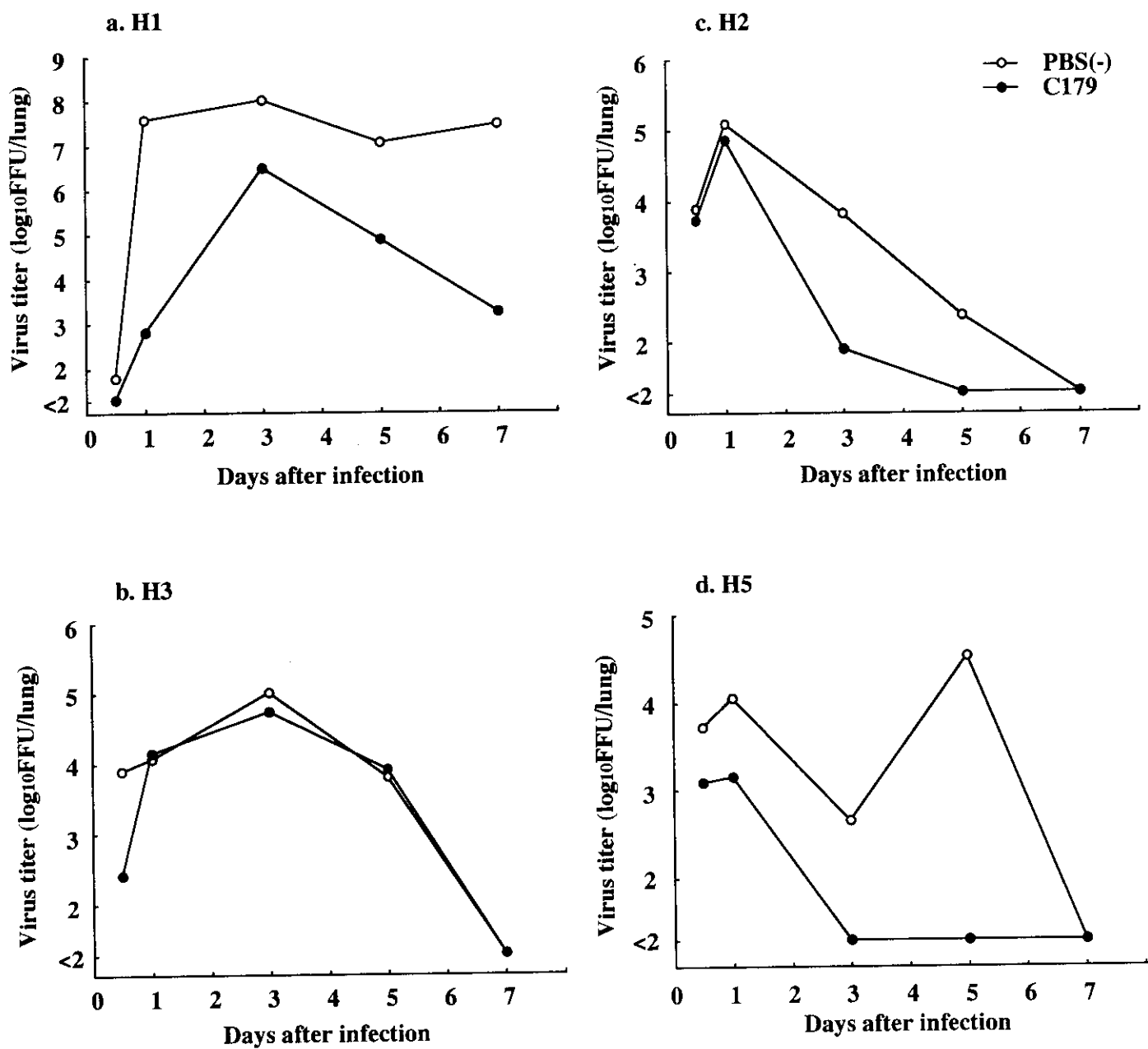


Figure 3. Titers of virus in the lung of mice receiving PBS or 1mg of C179 per mouse 1 day before the virus challenge