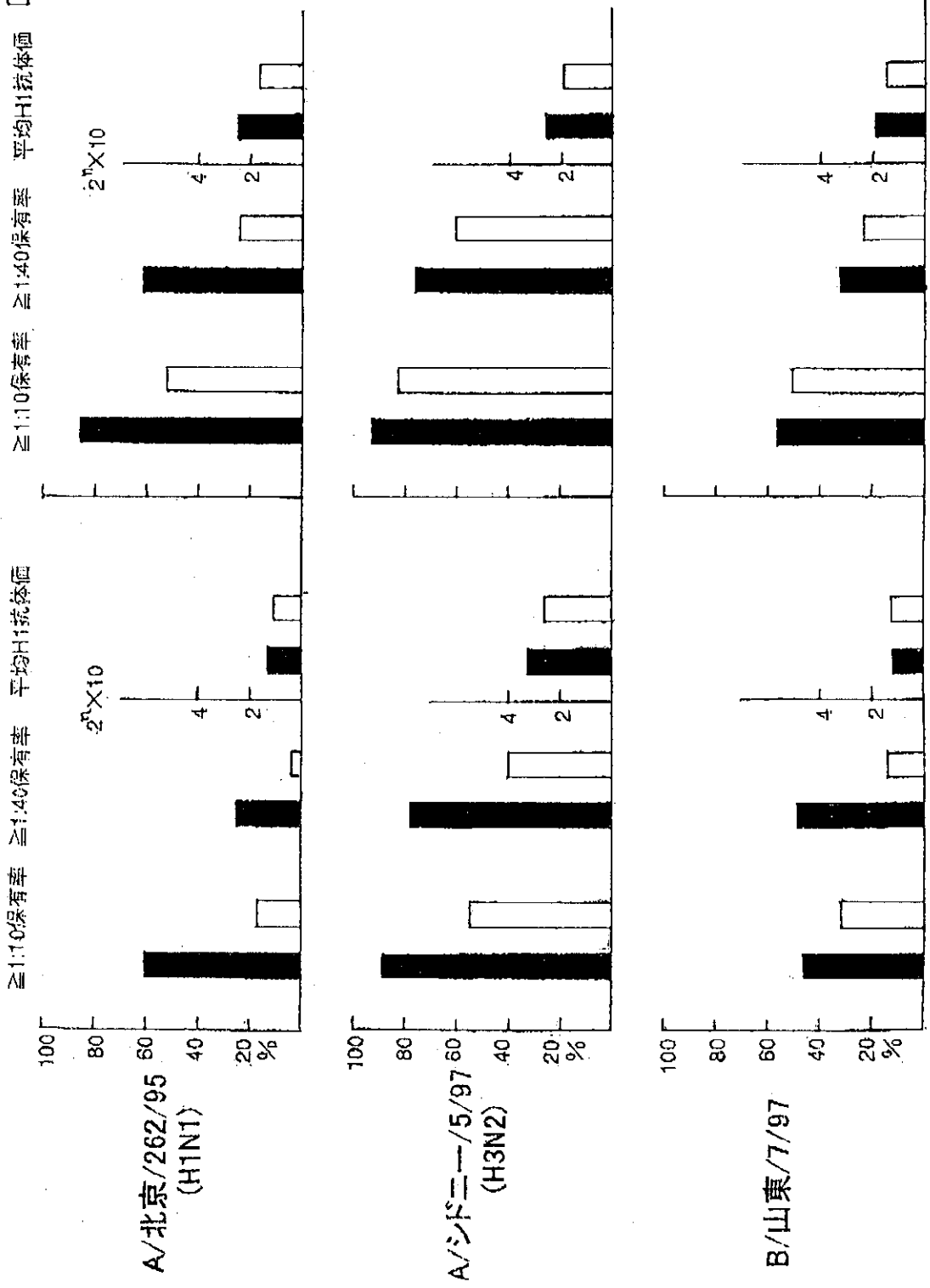


入 所 者 職 員

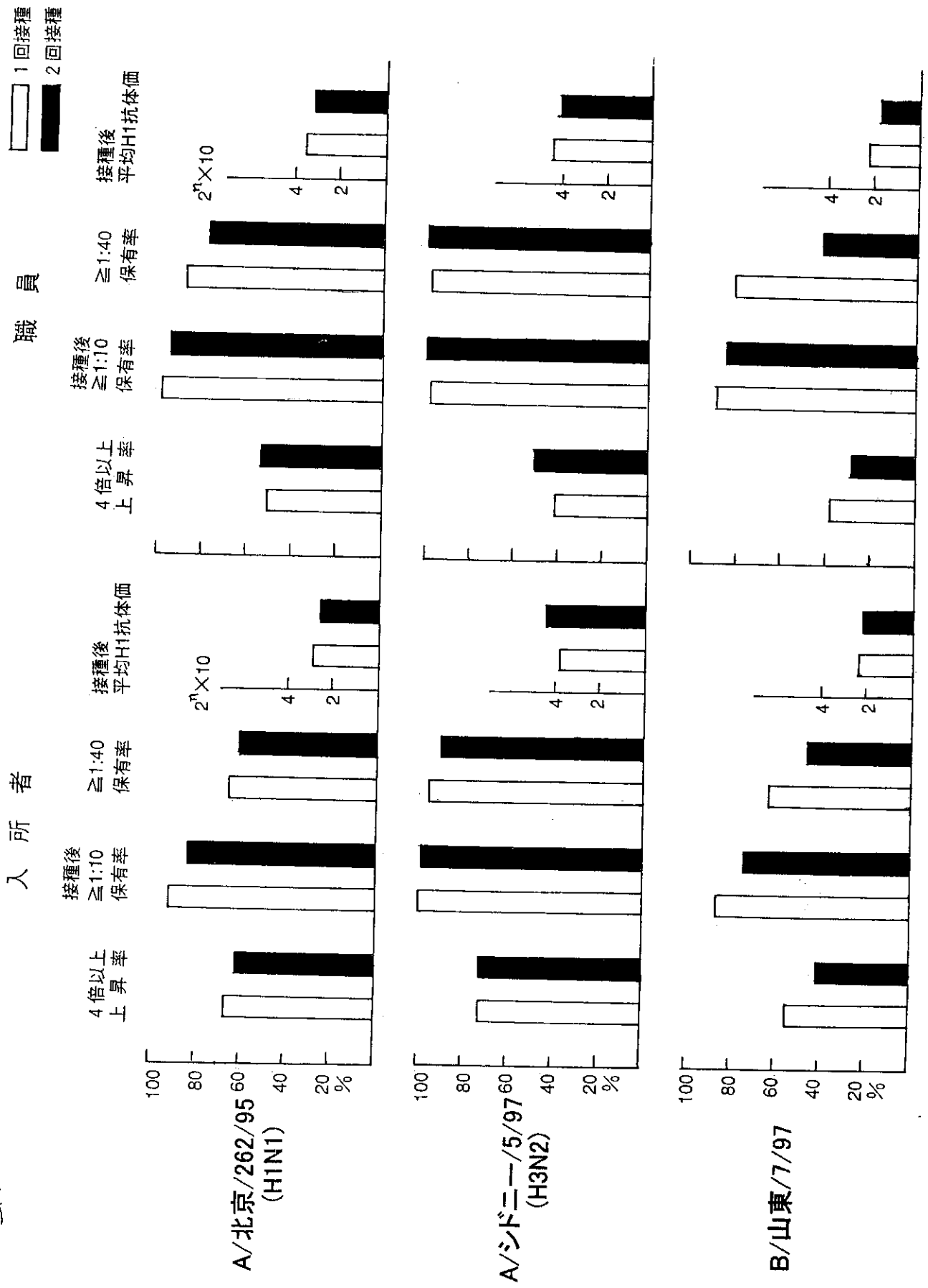
1997 1998
ワクチン接種
あり
なし

図4



1997年、1998年ワクチン接種の有無別 1999年接種前抗体保有状況

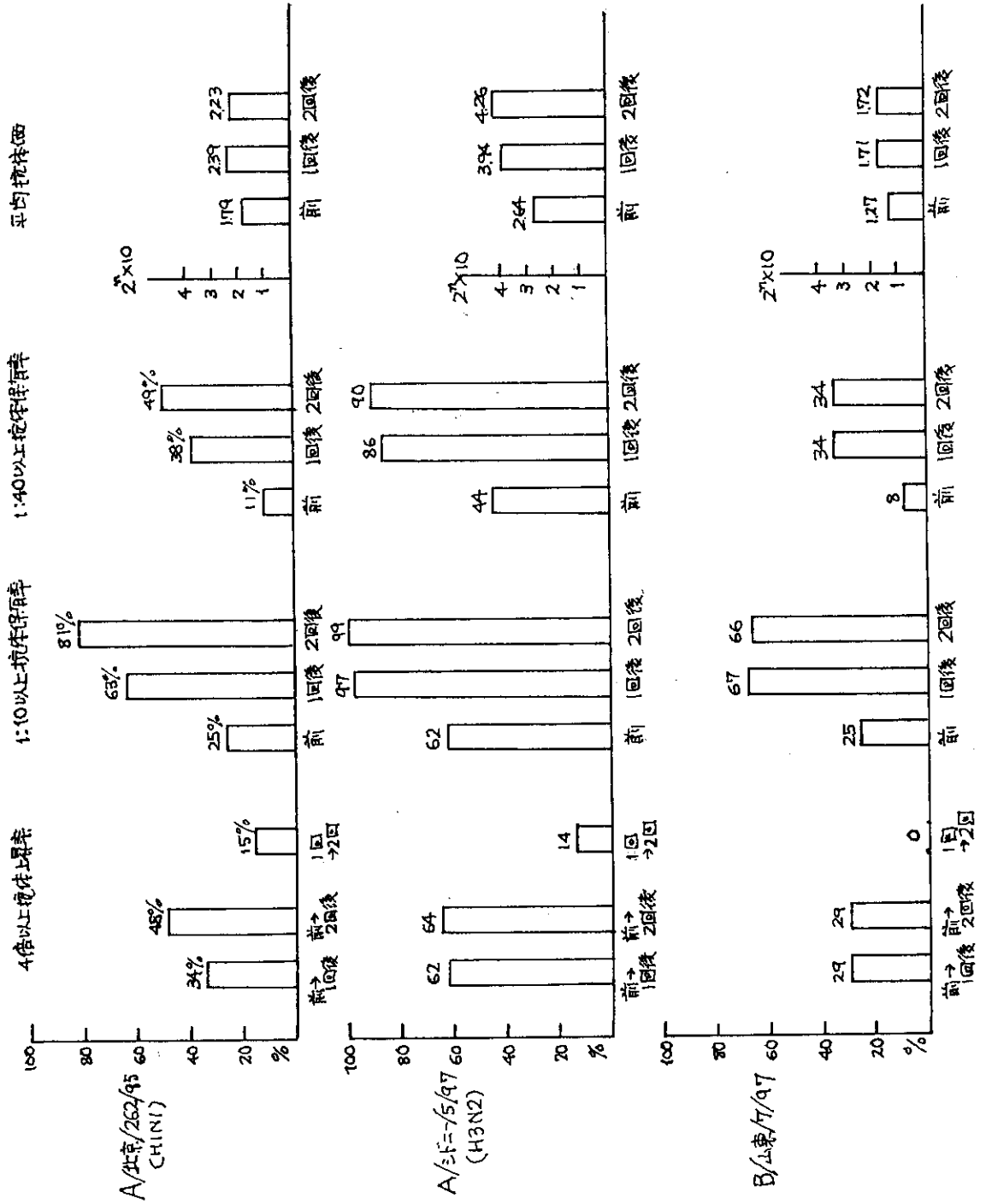
図5



1回接種、2回接種後の抗体保有状況

図6

インフルエンザワクチン接種後の抗体保有状況 老人保健施設E. 入所者 73例 1999-2000年シーズン



あり
なし

入 所 者 1 回 接 種 入 所 者 2 回 接 種

4倍以上
上昇率

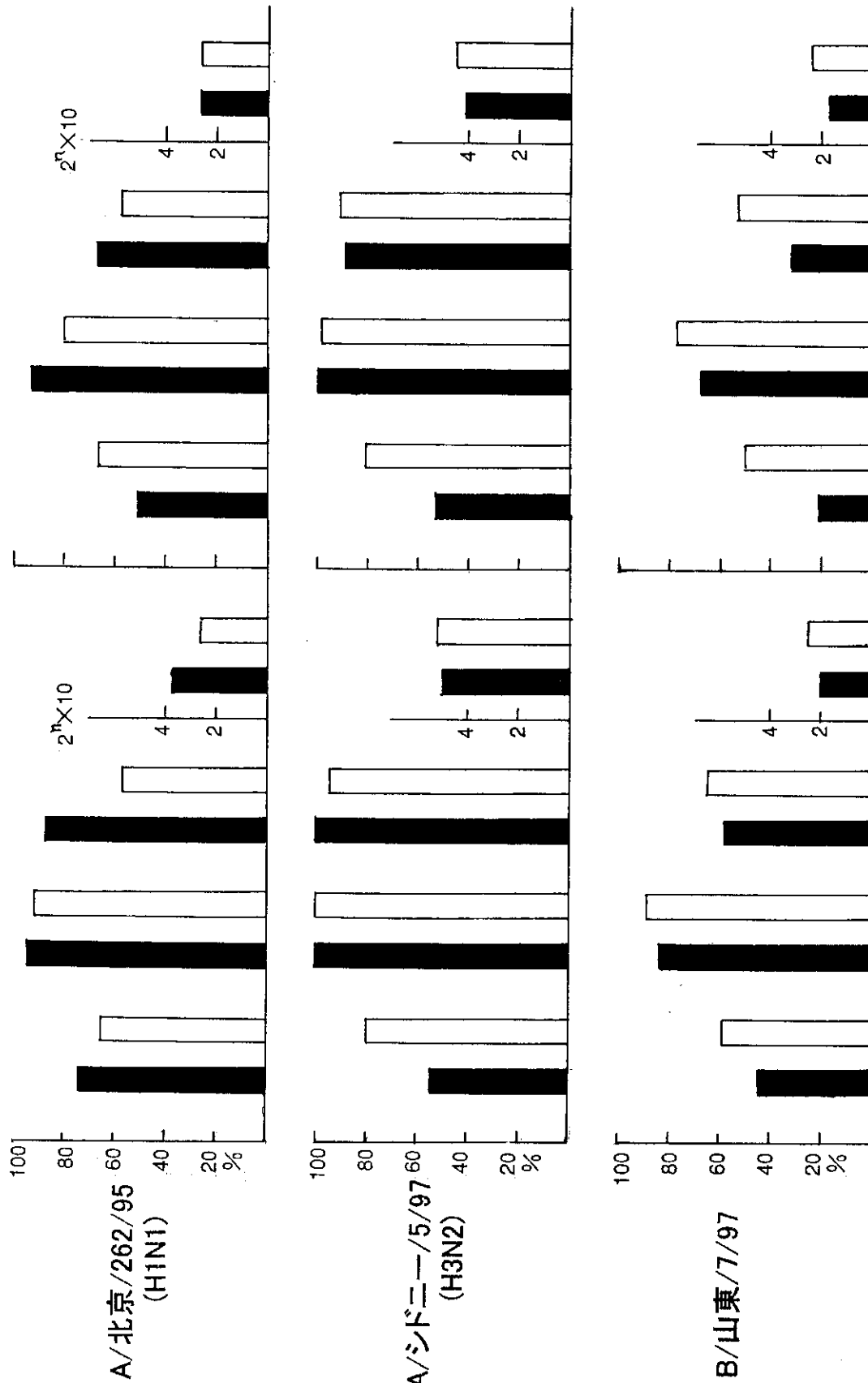
接種後
平均H1抗体価
≥1:10保有率

接種後
平均H1抗体価
≥1:40保有率

接種後
4倍以上
上昇率

接種後
平均H1抗体価
≥1:10保有率

接種後
平均H1抗体価
≥1:40保有率



1997.1998年ワクチン接種の有無別、1997年(四)2回接種後の抗体保有状況

ア(8)ー(2)

職員 1997 1998
ワクチン接種
あり

4倍以上
上昇率

接種後
≥1:10
保有率

接種後
平均H1抗体価

4倍以上
上昇率

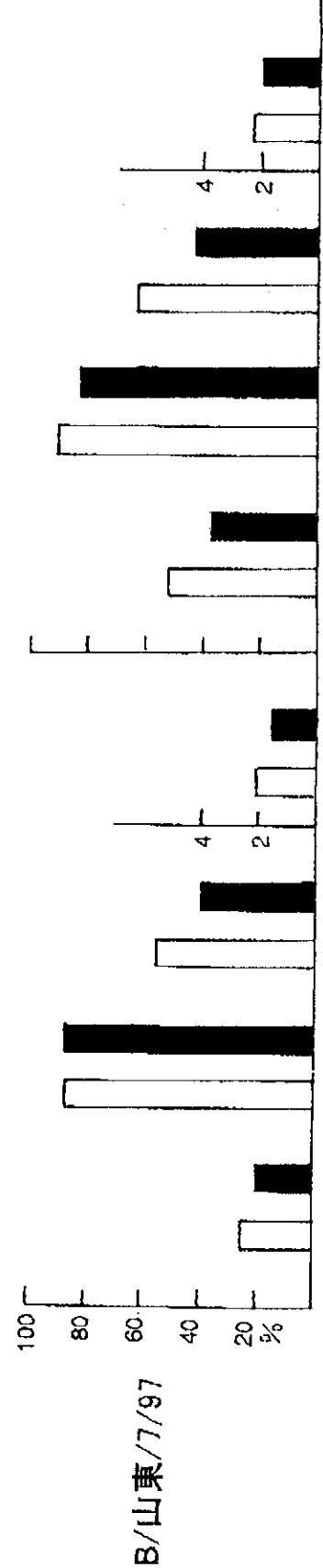
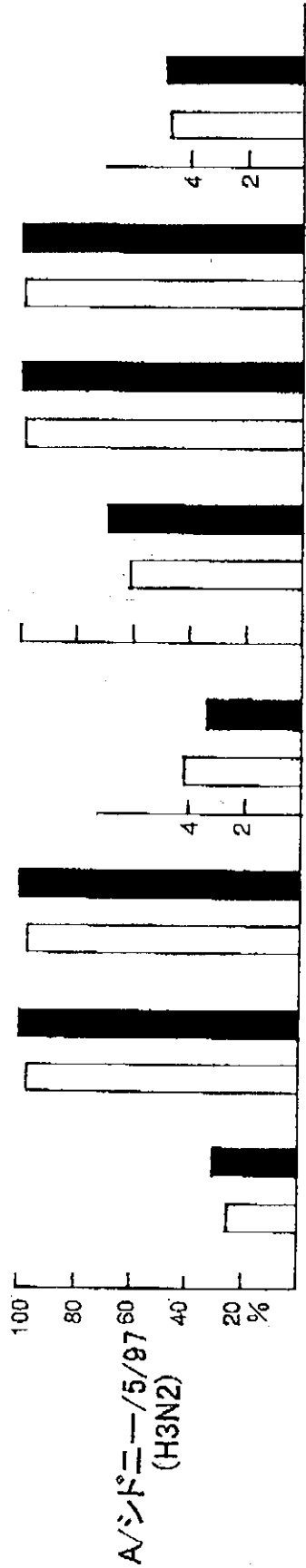
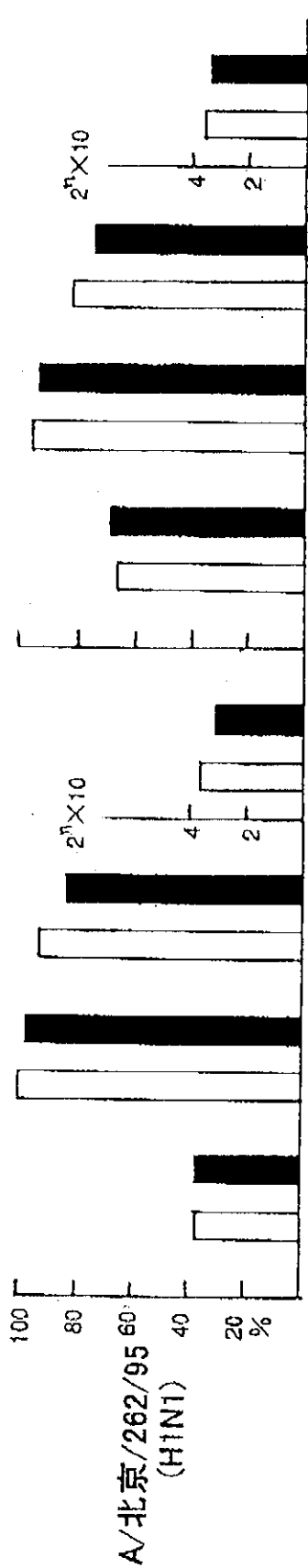
接種後
≥1:10
保有率

職員 1997 1998
ワクチン接種
なし

接種後
平均H1抗体価

≥1:40
保有率

1回接種
2回接種



1997、1998年ワクチン接種の有無別、1999年1回、2回接種後の抗体保有状況

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザウイルスの分子系統解析の自動化システムの開発

分担研究者 五條堀 孝 国立遺伝学研究所生命情報研究センター長・教授

研究要旨

新規インフルエンザウイルスの遺伝子配列を与えると、データベース中の配列と比較し、マルチプルアラインメントの作成から分子系統樹の作成まで自動的に行い表示するシステムの設計と構築を行った。また、このシステムをネットワークを経由して用いるためのWWWインターフェースの構築を行った。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

C. 研究成果

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

PC上で稼働させ、そのシステム上で、ゲノム上の位置情報とサブタイプ情報をもとにして各既知の遺伝子配列をサブタイプごとに分類した。さらに、この情報をもとに、サブタイプ群を分子進化学的に細分類した。これらのデータの表示を解析のためのインターフェースの設計と開発を進めた。また、マルチプルアラインメント、系統樹の結果をWWWシステムにより利用できるようにビューワーの開発をおこなった。さらにいくつかの、分子進化学的解析方法の本システムへの応用の検討をおこなった。

D. 考察

本年度の開発研究によって、インフルエンザウイルスの分子進化学的自動解析システムの仕組みは完成した。さらに、各研究者による利用のための利便性を、計算機ネットワークを用いたシステムへの接続や、計算機の利用に慣れ親しんでいない人にも簡単に利用できるユーザインターフェースの開発・整備を進めることができた。また、解析結果の視覚的な表示に関して一定の成果を得ることができた。しかし、現段階では、分子進化学的に分類を行うのみであるが、今後、新規ウイルスに対するワクチン開発のための機能をさらに加えて、より有効に利用できるような解析システムを作成するとともに、配列データベースの充実をはかる必要がある。

E. 結論

インフルエンザウイルスの分子進化学的自動解析システムの仕組みは完成した。また、解析システムの充実をねらいとして、特にワクチン開発への応用を目的とした本システムを利用してインフルエンザウイルス蛋白質の各々のアミノ酸座位における自然選

抗原を解析し、宿主の免疫応答からのウイルス粒子の逃避に重要と考えられるアミノ酸座位を進化的側面からの方法やウイルスゲノムにおける組み換えを検定する方法の開発も開発された。これらの研究成果は、今後のインフルエンザの基礎研究・臨床の両面においておおいに役立つことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, Y., Wyndham, A., and Gojobori, T. (2001) 14. Virus Evolution. Handbook of statistical genetics, eds. D.J.Balding, M.Bishop, and C.Canning. *John Wiley & Sons*. 377-413.

Shimizu, N. and Gojobori, T. (2000) How can human and simian immunodeficiency viruses utilize chemokine receptors as their coreceptors? *GENE* 259(1-2): 199-205.

Nakane, S., Shirabe, S., Moriuchi, R., Mizokami, A., Furuya, T., Nishiura, Y., Okazaki, S., Nakamura, N., Suzuki, Y., Nakamura, T., Katamine, S., and Gojobori, T. (2000) Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members of a family with a discordant HTLV-I associated myelopathy in monozygotic twins. *Journal of Neuro Virology*. 6: 275-283.

Suzuki, Y., Yamaguchi-Kabata, Y., and Gojobori, T. (2000) Nucleotide substitution rates of HIV-1. *AIDS Reviews*. 2(1): 39-47.

Yamaguchi-Kabata, Y. and Gojobori, T. (2000) Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J.Virology*. 74(9):4335-4350.

新井 理、五條堀 孝 (2000) 「15 DNA 情報解析」
『医学・薬学研究者のためのバイオテクノロジー概論』木村彰方編 医薬ジャーナル社. pp 307-319.

鈴木善幸、五條堀 孝 (2000) 「(suggestion) 病原性ウイルスの遺伝子型分類について」. 『治療学』ライフサイエンス出版 Vol.34 No 9 pp 30-31.

五條堀 孝(2000)「ウイルスの進化」 第9回日本組織適合性学会大会シンポジウム II 「ウイルス感染とHLA」 MHC Vol.7, No.1 pp35

五條堀 孝、鈴木善幸(2000) 「(インフルエンザの生態学 3) ウイルスの進化と予測」『治療学』ライフサイエンス出版 Vol.34, No.1 pp22-26

2. 学会発表

Gojobori, T.(2000) “ A method for detecting positive selection at single amino acid sites and its applications “ Neutralism and Selectionism, Stanzione Zoologica Anton Dohrn (Ischia Island, Naples)
5月4日

Gojobori, T.(2000) “ Synonymous/nonsynonymous substitution analysis of viral genes “ The 6th European Workshop on Virusevolution and Molecular Epidemiology, University of Leuven (Belgium) 9月9日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザウイルス合併症（脳炎・脳症）の研究

分担研究者 豊田哲也 久留米大学医学部ウイルス学講座主任教授

研究要旨 小児におけるインフルエンザウイルス脳炎・脳症の病因の解明を目的として、1998年から2000年の3年間にわたり、脳炎・脳症の症例について血清抗体価、ウイルス分離と、末梢血リンパ球（PBMC）・髄液のRT-PCRによるウイルス遺伝子の同定を行い、あわせて宿主因子のひとつとしてHLA型との検討を行った。そして、以下の5点を明らかとした。1)PBMC、髄液中のウイルス遺伝子の検出とインフルエンザウイルス脳炎・脳症の発症との間に関連のある症例もあったが、関連のない症例もあった。2)インフルエンザウイルスによる脳炎・脳症の病態は複数である。3)HLA B60と脳炎・脳症との関連が示唆される（中間報告）。4)ワクチン接種者には脳炎・脳症発症者はいなかった。また、5)長期のアマンタジン服用者からアマンタジン耐性ウイルスが分離されたが、その耐性ウイルスが広がる可能性はないと思われた。

研究協力者

濱田信之、原 好勇、岩橋 潤、柏木孝仁、今村宜寛
（久留米大学医学部ウイルス学講座）

木村彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患
研究部門分子病態分野）

高橋三津雄、山田達夫（福岡大学医学部第5内科）

加藤裕久、津村直幹、升永憲治、大津 寧、吉田一郎
（久留米大学医学部小児科学講座）

満留昭久、山口 覚、（福岡大学医学部小児科学講座）

坂田則行（福岡大学医学部病理学講座）

松尾宗明、宮崎澄雄、（佐賀医科大学医学部小児科学
講座）

泉 達郎、浜田優美（大分医科大学医学部小児科学講
座）

森内浩幸、松坂哲應（長崎大学医学部小児科学講座）

布井博幸（熊本大学小児科学講座、宮崎医科大学小児
科学講座）

濱田哲夫（産業医科大学病理学講座）

野口英太郎、上田竜生（長崎県衛生公害研究所）

梶原淳睦（福岡県保健環境研究所）

森 良一（日本環境衛生センター）

船津丸貞幸（佐賀県衛生研究所）

塚本伸哉（大分県衛生環境研究センター）

城野洋一郎（化学及血清療法研究所）

七種啓行（さいくさ小児科）

出口雅経（出口小児科）

中下誠郎（佐世保総合病院）

松尾厚子（長崎市民病院）

神戸正彦（かんべ小児科）

浦部大策（聖マリア病院）

日高靖文（唐津赤十字病院）

藤本 保（藤本小児病院）

福田 肇（大村市立病院）

池口弘一、森 裕美（大手町病院）

野口哲彦（野口内科こども医院）

山下恭輔（平戸市民病院）

松尾光弘（五島中央病院）

田中茂樹、末長宜弘（長崎中央病院）

立花一憲（対馬いづはら病院）

岡 尚記（佐世保共済病院）

楊井正樹（やない小児科医院）

辻 克郎（辻クリニック）

吉岡明彦（広島県廿日市保健所）

A. 研究目的

ヒトにおけるインフルエンザウイルス感染は局所粘
膜感染の典型とされてきた。ところが、我国では1994
年の予防接種法改正によるワクチンの任意接種化にと
もなう接種率の激減と相まって、とくに小児における
脳炎・脳症の合併例が散発し、全身感染型の経過をと
る症例が決して少なくないことが認識されるようにな
った。そして、末梢血リンパ球（PBMC）、赤血球画
分、髄液（CSF）からのウイルスゲノムRNAの同定
の報告が行われたが、そのうちのいくつかは実験室内
コンタミネーションを検出している可能性があり、イ

インフルエンザウイルス感染はどのくらいの頻度でウイルス血症（全身感染）をおこすのか、また、脳炎・脳症の症例における CSF 中のウイルスゲノムの検出頻度と病態との関連についてはまだよくわかっていない。

そして、ヒトにおけるインフルエンザウイルスによる脳炎・脳症をはじめとする重症合併症は、ウイルスの遺伝子に支配される要因ではなく、むしろ宿主の側の要因によることが考えられる。我々は、ヒトにおけるインフルエンザウイルス脳炎・脳症の病因として、1) マウス・ニワトリのモデルと同じく、ウイルス血症を介しておこり、脳におけるウイルス増殖により発症する 2) 宿主の特殊な反応により発症する 3) 嗅神経経由に脳に浸潤して増殖し発症するという3つの仮説をたて、その病因を解明することを目的として研究を行った。そして、脳炎・脳症の症例について血清抗体価、ウイルス分離と、末梢血リンパ球 (PBMC)・髄液の RT-PCR によるウイルス遺伝子の同定を行い、あわせて宿主因子のひとつとして HLA 型と脳炎・脳症発症との関連について検討を行った。

ワクチンはウイルス感染の制御（予防）において効果的な方法と考えられるが、インフルエンザウイルス感染においては過去の集団接種は効果がないという判断により、1994 年以降、実質上ほとんど行われなくなった。1999 年以降は再び接種率が上昇し始めたが、現行のワクチンの、インフルエンザ脳炎・脳症への効果については全く解析されていない。そこで、ワクチンの脳炎・脳症発症防止について解明を行う。

また、1998 年 11 月に A 型インフルエンザウイルス感染の治療薬としてアマンタジンの使用が承認されると、わが国では急速にアマンタジンがインフルエンザウイルス感染に使用されるようになった。小児に対しても広く投与されているようであるが、このような投与によるアマンタジン耐性ウイルスの出現頻度とその拡散について調べる。

B. 研究方法

症例 長崎県、福岡県、佐賀県、大分県、熊本県において 1998 年シーズン (1997-1998 年シーズン) から 2000

年シーズン (1999-2000 年シーズン) の 3 年間 (3 冬季) にわたりインフルエンザウイルス感染症の症例中、呼吸器感染の患児と脳炎・脳症あるいはその他の重篤な合併症を示した患児の受診時の咽頭拭い液、末梢血リンパ球、血清を採取した。脳炎・脳症の症例からはさらに髄液を採取した (<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/index.html>)。また、死亡例からは組織を採取した。咽頭拭い液、血清、髄液からは MDCK 細胞を用いてウイルスの分離・同定を行った。また、2000 年シーズンにはインフルエンザウイルス迅速診断キットを併用した。

リンパ球分離・ウイルス遺伝子の同定・HLA 型の決定
リンパ球、髄液からセパゾール (フナコシ) にて RNA を抽出し、HA 遺伝子を標的として A H1 型、A H3 型、B 型特異的 Nested RT-PCR を行った。HLA は MicroSSP Genetic HLA Class I, Class II DNA typing tray (One Lambda) を用いて PCR-SSP 法により決定した。アマンタジン抵抗性ウイルスの分離 アマンタジンをインフルエンザウイルス感染とは関係のない疾患で長期にわたり投与されている患者を 1998 ~ 2000 年の 2 冬季にわたり、同一施設 (いわゆる老人病院) において調査し、ウイルスを分離し、M2 蛋白の構造の解析とアマンタジン感受性を調べた。
(倫理面への配慮)

HLA の測定に関しては各臨床医から、患児の保護者 (親) に対して説明を行い、文書による同意を得てから採血した。さらに、HLA 型測定用のサンプルと患者個人の認識ができないように全て、記号により識別を行った。(久留米大学医学部倫理委員会研究番号 9932)

C. 研究結果

HLA 型 現在集めた全ての症例についての解析結果が出そろってはいないので、中間的な総括であるが、調べたインフルエンザウイルス症例の HLA 型を調べると、臨床的ライ症候群、脳炎・脳症と診断された症例は全て HLA B60 を有していた (100%)。

PBMC、髄液からのウイルス遺伝子の検出 (現在、結果は出そろってはいない)

表 1 インフルエンザウイルス感染者の HLA 型

	1998 年シーズン	1999 年シーズン	合計
インフルエンザ感染例	27	33	60
HLA 型判定例	15	22	37
HLA B60	7	0	7
脳炎脳症、Reye 症候群	4	0	4
呼吸器感染	3	0	3

表2 ウイルスゲノム RNA の検出

	1998年シーズン	1999年シーズン	合計
インフルエンザ感染例	27	33	60
PBMC	27	29	56
検出した	12	0	12
検出しない	15	29	44
髄液	9	0	9
検出した	2	0	2
検出しない	7	0	7

剖検 1998年シーズンに臨床的に出血性ショック・脳症(HSE)の経過をとった2歳女児例を1例、2000年シーズンに臨床的に急性壊死性脳症を呈した1歳女児例と基礎疾患として発達遅延をもつ1歳男児例の2例の計3例の剖検を行った。両例とも初期呼吸器感染巣は、肺胞壁の肥厚、炎症細胞浸潤からなる間質性肺炎の像を呈した。以下にそのまとめを記載する。

症例1998-10 HSE (Aホンコン型)

- 1) 脳内でのウイルスゲノム、抗原の局在を同定した。
- 2) 検索した全ての臓器でHA遺伝子をRT-PCRにて検出した。脳内病変は、明らかな炎症細胞浸潤を欠き、脳幹部の広範な神経細胞にウイルス抗原を認めた。小脳では、プルキンエ細胞の一部が濃染した。後頭蓋窩に強い変化はこれまでの画像所見での、視床～脳幹部病巣に対応すると考えられる。単純な脳浮腫以外にウイルスの直接浸潤が疑われる。
- 3) ウイルス抗原陽性リンパ球(CD8陽性Tリンパ球)は、ウイルス血症の可能性を示唆する。
- 4) しかし、心停止時にウイルス血症は確認できなかった。

症例2000-1 急性壊死性脳症 (Aソ連型)

- 1) CT所見では、橋および中脳背側部、視床下部、視床に左右対称性の低信号域を認め、病理所見では、同

1AD(+2) が分離された。しかし、これらのウイルスが同一シーズン、及び、2000年シーズンに流行する証拠は得られなかった(図1)。

同部は茶褐色の色調変化を呈し、壊死軟化病変が疑われた。大脳深部白質に微小出血を散在性に認めた。

2) 腸管ではリンパ球形成、腸間膜リンパ節腫大を認めた。

3) PBMC、髄液からはウイルスゲノムRNAは検出されなかった。

4) in situ hybridizationにより、肺胞上皮細胞にウイルスRNAを検出したが、脳の病理所見の存在した部位にはウイルスRNAは検出できなかった。

アマンタジン抵抗性ウイルス アマンタジン服用者から、1999年シーズンに2株の抵抗性ウイルス(AD(+1)、AD(+2))が分離された。しかし、これらのウイルスが同一シーズン、及び、2000年シーズンに流行する証拠は得られなかった(図1)。

D. 考察

日本人におけるHLA B60の保有率は12.9%であるので、今回得られた結果は、インフルエンザウイルス脳炎・脳症(臨床的ライ症候群を含む)症例のHLA B60保有率100%は有意に高い(odds ratio=60.1、p=0.0001、

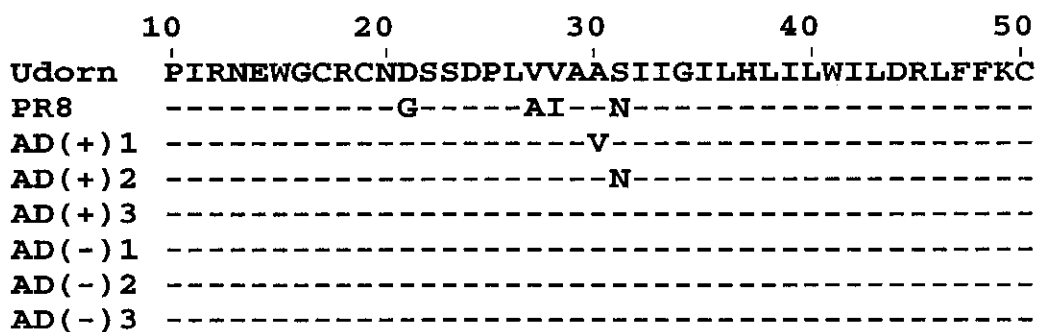


図1 アマンタジン抵抗性ウイルスのM2イオンチャンネルのアミノ酸構造

1999年シーズンに同一施設(いわゆる老人病院)において、アマンタジン服用者(AD(+1)~3)と非服用者(AD(-1)~3)から分離したA型インフルエンザウイルスのM2イオンチャンネルのアミノ酸構造を比較した。アマンタジン感受性のUdorn株と異なるアミノ酸のみを示した。尚、PR8株はアマンタジン抵抗性を示す。

pc<0.0004)。日本人の人口における保有率が12.9%あるHLA B60が単独でインフルエンザウイルス感染の脳炎・脳症（重症化）発症の因子となるとは考えにくい。

1998年シーズンにはAホンコン型による脳炎と思われる10ヶ月女児例1998-26を経験した。この例ではPBMC、CSFにウイルスゲノムRNAを検出した。そして、経時的頭部CT・MRIおよび脳波にて多巣性脳障害が確認された。神経学的予後は、精神・知能的には良好であったが、痙性四肢麻痺が残った。ところが、剖検した2例では脳に於けるウイルスの増殖を示唆するような所見は得られなかった。これは、脳（CSF）や血液中におけるウイルスの検出と脳炎・脳症という病態が必ずしも一致しない、すなわち、全身感染がなくても脳炎・脳症を発症する場合があることを示している。

欧米では老人施設（nursing home）でのアマンタジン耐性ウイルスの発生が問題とされているが、わが国でもいわゆる「老人病院」においてはアマンタジン耐性ウイルスが出現する可能性があることがわかった。しかし、そのアマンタジン耐性ウイルスの感染が拡大する証拠は得られなかった。したがって、アマンタジン耐性ウイルスは問題とはならないと考えられるので、アマンタジンの積極的な投与は脳炎・脳症の予防・治療として考慮してもよい。

E. 結論

1. インフルエンザウイルス脳炎・脳症には、脳にウイルスが感染した例とそうでない例（出血性ショック・脳症（HSE）、急性壊死性脳症）の少なくとも3種類の病態があった。
2. HLA B60とインフルエンザウイルス脳炎・脳症（重症化）との関連が示唆された。しかし、日本人の12.9%が有するHLA B60が単独でインフルエンザウイルス感染の脳炎・脳症（重症化）発症の因子となるとは考えにくいので、他にも宿主因子を探す必要がある。
3. 現在までのところアマンタジン耐性ウイルスは出現しても問題にはならない。
4. 全国的調査では、ワクチン接種者からも脳炎・脳症の発症者が報告されているが、我々の調査の範囲内では発症者はいなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitsuo Takahashi, Tatsuo Yamada, Yoshio Nakashita, Hiroaki Saikusa, Masaori Deguchi, Hiroshi Kida, Masato

Tashiro and Tetsuya Toyoda. Influenza virus-induced encephalopathy: Clinicopathologic study of an autopsied case. *Pediatr. Int.* 42: 204-214, 2000.

2. Katsuro Tsuji, Koji Toyomasu, Yoshihiro Imamura, Hisao Maeda, and Tetsuya Toyoda. No association of Borna disease virus with psychiatric disorders among patients in Northern Kyushu, Japan. *J. Med. Virol.* 61:336-340, 2000.

- Takahito Kashiwagi, Nobuyuki Hamada, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Tatsuo Ueda, Hidetaro Noguchi, and Tetsuya Toyoda. Emergence of new influenza A viruses which carry an escape mutation of the HLA-B27-restricted CTL epitope of NP in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 44: 867-870, 2000.

3. Tetsuya Toyoda, Yoshihiro Imamura, Hiroshi Takaku, Takahito Kashiwagi, Koyu Hara, Jun Iwahashi, Yasushi Ohtsu, Naoki Tsumura, Hirohisa Kato, Nobuyuki Hamada. Inhibition of influenza virus replication in cultured cells by RNA-cleaving DNA enzyme. *FEBS Lett.*, 481: 113-116, 2000.

4. M. Hatta, Y. Asano, K. Masunaga, T. Ito, K. Okazaki, T. Toyoda, Y. Kawaoka, A. Ishihama, and H. Kida. Epitope mapping of the influenza A virus RNA polymerase PA using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 145: 895-903, 2000.

5. M. Hatta, Y. Asano, K. Masunaga, T. Ito, K. Okazaki, T. Toyoda, Y. Kawaoka, A. Ishihama, and H. Kida. Mapping of functional domains on the influenza A virus RNA polymerase PB2 molecule using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 145: 1947-1961, 2000.

6. T. Toyoda, K. Masunaga, Y. Ohtsu, K. Hara, N. Hamada, T. Kashiwagi, and J. Iwahashi. Antibody-scanning and epitope-tagging methods: Molecular mapping of proteins using antibodies. *Curr. Protein Peptide Sci.* 1: 303-308, 2000.

7. T. Toyoda, S. Kaminaka and T. Kitagawa. Application of ultraviolet resonance Raman spectroscopy on the analysis of bovine enterovirus structure. *Proceedings of The XVIIth International Conference on Raman Spectroscopy*. Wiley (Shu -Lin Zhang & Bang-fen Zhu eds.) 920-921, 2000.

8. Y. Ohtsu, H. Kato and T. Toyoda. Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: Fine mapping of the influenza virus RNA polymerase subunit binding sites. In 'Options for the control of influenza IV, ICS 1219 (Albert D.M.E. Osterhaus, *et al.* eds.), Elsevier, Amsterdam, in press, 2000.

9. K. Hara, H. Kido and T. Toyoda. Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit. In 'Options for the control of influenza IV, ICS 1219 (Albert D.M.E. Osterhaus, *et al.* eds.), Elsevier, Amsterdam, in press, 2000.

10. M. Takahashi, T. Yamada and T. Toyoda. Detection of

viral antigens in the encephalopathy brain by influenza A virus. In 'Options for the control of influenza IV, ICS 1219 (Albert D.M.E. Osterhaus, *et al.* eds.), Elsevier, Amsterdam, in press, 2000.

11. Koyu Hara, Mayumi Shiota, Hiroshi Kido, Yasushi Ohtsu, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Nobuyuki Hamada, Kazutoshi Mizoue, Naoki Tsumura, Hirohisa Kato, Tetsuya Toyoda. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 in the active site. *Genes to Cells*, 6: 87-98, 2001.

12. Jun Iwahashi, Katsuro Tsuji, Tetsuya Ishibashi, Junboku Kajiwara, Yoshihiro Imamura, Ryoichi Mori, Koyu Hara, Takahito Kashiwagi, Yasushi Ohtsu, Nobuyuki Hamada, Hisao Maeda, Michiko Toyoda, Tetsuya Toyoda. Isolation of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses (H3N2) from Patients Following Administration of Amantadine in Japan. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2001.

14. 豊田哲也 インフルエンザウイルス脳炎・脳症の重症化因子を探る. *日本医事新報*, 3978: 27-29, 2000

15. 豊田哲也, 原 好勇 感染分子機構から見た治療薬開発の方向性、治療学, 34号 (1号)、44-49, 2000

16. 原 好勇, 豊田哲也 抗インフルエンザウイルス薬. *治療学*, 34: 981-986, 2000

17. 高橋三津雄, 山田達夫, 喜田 宏, 中下誠郎, 七種啓行, 出口雅経, 豊田哲也 インフルエンザ脳症の剖検例. *治療学*, 34: 105-108, 2000

18. 豊田哲也 再び注目されるインフルエンザウイルス、感染防止、10 (7)、1—8 (2000)

19. 高橋三津雄, 山田達夫, 中下誠郎, 池口弘一, 豊田哲也 インフルエンザ脳症の病理学は何を教えるか. *小児科診療*, 63: 2074-2078, 2000

2. 学会発表

1. 大津 寧, 原 好勇, 豊田哲也 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの分子解剖: PA プロテアーゼの解析 サブユニット結合部位のファインマッピング 第15回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (2000年4月22日~24日, 三島)

2. 原 好勇, 塩田真由美, 木戸 博, 豊田哲也 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットはセリンプロテアーゼ活性を持つ 第73回日本生化学会大会 (2000年10月11日~14日, 横浜)

3. 原 好勇, 木戸 博, 豊田哲也 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットのキモトリプシン様プロテアーゼ活性について 第48回日本ウイルス学会学術集会 (2000年10月12日~14日

, 三重)

4. 大津 寧, 豊田哲也 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのサブユニット間結合部位 第48回日本ウイルス学会学術集会 (2000年10月12日~14日, 三重)

5. 豊田哲也, インフルエンザウイルス脳炎研究会. インフルエンザウイルス脳炎・脳症の研究3 第48回日本ウイルス学会学術集会 (2000年10月12日~14日, 三重)

6. 高橋三津雄, 池口弘一, 山田達夫, 坂田則行, 豊田哲也 インフルエンザ脳症 (急性壊死性脳症) が疑われる剖検例 第48回日本ウイルス学会学術集会 (2000年10月12日~14日, 三重)

7. 原 好勇, 木戸 博, 渡辺 健, 永田恭介, 豊田哲也 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットとマトリックスタンパクM1との相互作用の解析、第23回日本分子生物学会年会 (2000年12月13日~16日, 神戸)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

SRID法によるワクチン力価測定法の開発に関する研究

分担研究者 小田切 孝人 国立感染症研究所ウイルス1部呼吸器系ウイルス室長

研究要旨

新型インフルエンザ出現に備えてワクチンの国家検定の期間短縮を実現し、従来法の力価測定精度に関わる問題点を克服するために、一元放射免疫拡散試験法(Single radial immunodiffusion: SRID)の力価試験としての有用性及び有効性を評価した。SRID試験は、測定条件を一定にすることによりインフルエンザワクチンのHA抗原量を異なる研究室においても再現性良く測定することができた。SRID試験によって参照ワクチン以上の力価を示すものは、ほとんどすべて従来のマウスを用いた免疫原性を測定する力価試験で、参照ワクチン以上の力価を示し、従来法の力価試験の代替法とすることができると考えられた。一方、SRID試験を実施する上で、測定条件の一定化や測定に使用する標準抗原、参照抗血清の特異性についての問題も明らかになった。また、今回の研究ではワクチンに加える添加剤の影響や、ワクチンに使用するウイルス株によるSRID試験の測定結果に与える影響、および少数ではあったが従来法の力価試験と相関しないものの原因などについて今後も引き続き検討していく必要がある。

協力研究者

堀内善信 国立感染症研究所生物統計室長
板村繁之 国立感染症研究所ウイルス1部
主任研究官
西藤岳彦 国立感染症研究所ウイルス1部
主任研究官
斉藤利憲 国立感染症研究所ウイルス1部
呼吸器系ウイルス室研究員
渡邊真治 国立感染症研究所ウイルス1部
呼吸器系ウイルス室研究員
今井正樹 国立感染症研究所ウイルス1部
呼吸器系ウイルス室研究員
J.Wood National Institute for Biological Standards
and Control, UK
財団法人 細菌製剤協会

A. 研究目的

新型インフルエンザ出現の際には、迅速にワクチンを準備することが重要である。そのため従来インフルエンザワクチンの国家検定として実施されてきたマウスでの中和抗体産生能を測定する力価試験は、ワクチン検定に1ヶ月程度を要しそれに代わる試験法が求められている。一方、マウスを用いた力価試験自体にマウス個体間の免疫応答の差や、中和試験に用いる攻撃ウイルス量による力価測定の精度など技術的問題点が指摘されていた。本研究では、欧米で導入されているインフルエンザワクチンの力価試験である一元放射免疫拡散試験法

(Single radial immunodiffusion: SRID)の有用性及び有効性の評価を行い、インフルエンザワクチンの国家検定に導入するために必要な基礎的なデータを収集することを目的とした。

B. 研究方法

1) SRID試験

試験手順については英国の National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) で実施されている前年度の報告書に記載されている方法に準拠した。

標準インフルエンザHA抗原

1999-2000 シーズンのワクチンの評価には以下の標準インフルエンザHA抗原を使用した。
A/Beijing/262/95(H1N1)(X-127) [97/760]
A/Sydney/5/97(H3N2)(RESVIR-13) [99/614]
B/Shangdong/7/97 [98/774]

2000-2001 シーズンのワクチンの評価には以下の標準インフルエンザHA抗原を使用した。
A/NewCaledonia/20/99(H1N1)(IVR-116) [99/768]
A/Panama/2007/99(H3N2)(RESVIR-17) [99/830]
A/Panama/2007/99(H3N2)(NIB-41) [NIID]
B/Yamanashi/166/98 [99/828]

参照抗インフルエンザHA抗血清

1999-2000 シーズンのワクチンの評価には以下の参照抗インフルエンザHA抗血清を使用し

た。

- ・ヒツジ抗 A/Beijing/262/95(H1N1)インフルエンザ HA 抗血清[98/772]
- ・ヒツジ抗 A/Sydney/5/97(H3N2)インフルエンザ HA 抗血清[98/768]
- ・ヒツジ抗 B/Shangdong/7/97 インフルエンザ HA 抗血清[99/590]

2000-2001 シーズンのワクチンの評価には以下の参照抗インフルエンザ HA 抗血清を使用した。

- ・ヒツジ抗 A/NewCaledonia/20/99(H1N1)インフルエンザ HA 抗血清[99/770]
- ・ヒツジ抗 A/Panama/2007/99(H3N2)インフルエンザ HA 抗血清[99/782]
- ・ヒツジ抗 B/Yamanashi/166/98 インフルエンザ HA 抗血清[00/442]

インフルエンザ HA ワクチン

1999-2000 シーズン用に日本国内で製造されたインフルエンザ HA ワクチン 24 ロットを解析に使用した。このワクチン製造には、下記のウイルス株が使用され、HA 蛋白の赤血球凝集活性の単位である CCA で表記されて下記の量の HA 蛋白がそれぞれ含有されている。

- ・ A/Beijing/262/95(H1N1)(X-127)
200CCA/ml 相当量
- ・ A/Sydney/5/97(H3N2)(IVR-108)
350CCA/ml 相当量
- ・ B/Shangdong/7/97 300CCA/ml 相当量

また、平成 11 年度参照インフルエンザ HA ワクチン（卵中和試験用）も解析に使用した。EU で市販されていたインフルエンザサブユニットワクチン EvagriP(Lot.No. N-13-99)も比較のため解析に加えた。このワクチンには、以下のウイルスの HA 蛋白をそれぞれ 15mg/0.5ml 含有している。

- ・ A/Beijing/262/95(H1N1)(X-127)
- ・ A/Sydney/5/97(H3N2)(RESVIR-13)
- ・ B/Yamanashi/166/98

このシーズンの WHO の推奨する B 型のウイルス株は B/Yamanashi/166/98 もしくは B/Shangdong/7/97 であった。

2000-2001 シーズン用に日本国内で製造されたインフルエンザ HA ワクチン 38 ロットを解析に使用した。ワクチン製造には、以下のウイルス株が使用され、ワクチンには 15mg/0.5ml 以上の HA 蛋白が含有されている。

- A/NewCaledonia/20/99(H1N1)(IVR-116)
- A/Panama/2007/99(H3N2)(NIB-41)
- B/Yamanashi/166/98

また、平成 12 年度参照インフルエンザ HA ワクチン（卵中和試験用）も解析に使用した。

2) 解析方法

標準インフルエンザ HA 抗原を用いて各ワクチンの HA 蛋白含量を SRID 法によって測定した。HA 蛋白含量を求めるには、NIBSC で実施されている勾配比定量法と米国 FDA で実施されている平行線定量法の 2 法によった。

SRID 法による力価の測定精度について、同一事業所内及び事業所間について比較を行った。

C. 研究結果

SRID 法による測定結果の解析方法の検討

1999-2000 シーズン用に製造されたインフルエンザ HA ワクチン 24 ロットについて HA 含量の測定を実施し、まず力価を求めるための勾配比定量法と平行線定量法の 2 つの方法について検討を行った。SRID 法における測定値のように、測定値として例えば直径(あるいは沈降輪の面積)を得る場合、通常抗原量に依存した面積の沈降輪が形成され、抗原が 0 のとき測定値はウェルの直径に等しくなると考えられる。従って SRID 試験における沈降輪の直径を二乗した値は、一般的には抗原量に依存した回帰係数を持ち、近似的にはウェルの直径に等しい切片を持つ回帰直線となると考えられる。実際に回帰線の直線性に注目して SRID 試験の結果を見ると、図 1 のワクチンに含まれる A/H1N1 ウイルスの例にみられるように、必ずしも切片が等しい値とならない例が見受けられた。さらに、データは示さないが標準抗原よりも沈降輪の直径が明らかに小さいにも関わらず、標準抗原と

同等の回帰係数を示し、勾配比定量法では抗原量が多く見積もられてしまう例もある事が解った。理論的には勾配比定量法の成立が想定されるにも関わらず、切片が共通であるとの前提条件が満たされないデータが得られる事がある。この原因については今後検討の余地があると考えられる。

次に他の解析法として、平行線検定法が適用できるかどうかを検討した。この場合、反応を y 、回帰直線の勾配を b 、切片を a 、用量を x とすると、反応と用量の関係が $y = b x + a$ で表せるか、または b が共通(平行)となり、検体間の抗原量の違いを平行な回帰直線間の距離としてとらえることができる。ここで、平行線定量法が成立する条件として、 b が共通であることに加えて分散の均一性が求められる。よく見られるのは、分散が反応の大きさに依存して変化する場合である。この場合、平均値と分散の間に正の相関が認められる事が多い。実際に今回のデータについて見てみたところ、図2に示すように、沈降輪の直径の二乗の平均値と分散の間に有意な相関が見られた。そこで沈降輪の直径の対数変換値について同様の分析を行った。図3に示すように図2で認められた相関が消失した。ただし図3に見られるように、かなりのデータがいくつかの層を示すような分散の値をとることが解った。これは実際には、各群4個の沈降輪の直径の測定値があり、その測定値が、例えば同一値3個に0.1違うもの1個であったり、互いに0.1ずつ異なる2個ずつの測定値の組み合わせになっていたりといった、リング直径での分散が全く同じになってしまう測定値の組が生じる可能性が高いことによる。これは、今回の直径の測定法の精度に関連してみられた人為的なデータの偏りを示すものと考えられる。この偏りの程度は0.1以内と考えられるので、4個の平均値を用いるならば、実際上は無視しても問題は無いと考えられた。しかし統計解析を行う上では、データのばらつきが変則的になってしまう原因となることから、特別な扱いが必要になる。今回は、分散が0となって分散の均一性が崩れた場合について、観察時にばらつきが検出されなかった

ものと考え、全体としては分散が小さく見積もられることになるが、測定値の平均は大きく偏っていないものとして扱うこととした。平行線定量法を適用しようとする場合、沈降輪の直径は全体としてはウェル径の影響を受けており、低い用量でその影響は無視できない形になってしまうことが考えられる。実際に図1のデータを対数変換してみると、図4に示すように抗原用量の低いところで曲がりがありとなるが、高い抗原量のところでは平行な回帰線となった。各検体の標準抗原に対する相対力価を、勾配比定量法および平行線定量法の両方法で求め、関係を見たところ、図5に示すように良好な相関が認められ、両法の結果間に当てはめた関係式は傾き1.0で切片0となり、一致した値となることが解った。従って、当面いずれの解析法を用いても問題となるような食い違いは生じないものと思われる。

さらにこれら両解析法間で、測定値の再現性について違いが出るかどうかを調べた。この為に感染研と製造所で共通に測定された検体について、感染研での相対力価に対して製造所での相対力価を対比させて散布図を作成した。結果は図6および図7に示すように、いずれも感染研と製造所の測定値に良好な相関が見られた。しかし、勾配比定量法では傾きおよび切片からみて、平行線定量法に比べ再現性に問題がある可能性がある。今後さらに確認の必要があるが、図6と図7で見る限り平行線定量法での結果がより良好な再現性を示すと考えられた。

インフルエンザHAワクチンのSRID法による測定結果の施設間での再現性

次にSRID法の評価を行うため、感染研と製造所で共通に測定された参照ワクチンおよび11ロットのワクチンについての成績を用いて施設間での測定結果の再現性を調べてみた。先ず11ロットのワクチンに含まれるA/H3N2ウイルスについての相対力価の測定結果を図9に示す。図では各ロットともIからVまでの5ヶ所の製造所いずれかで各々3回と感染研で1回の計4回の測定値から求めた標準抗原に対する相対力価の対数値を、ロット毎にまとめて

95%信頼区間とともに示した。各ロットとも4つの結果のうち共通の力価が算定できるものについて、加重平均による力価の平均値を求め、各ロット毎に横線で示してある。ここで、成績が力価の平均値と有意に異なった場合は白抜きのマークで示した。各力価値について、X座標の軸目盛りとして、「ウイルスの型+ワクチンの製造所+検体番号+(実験番号)」あるいは「ウイルスの型+ワクチンの製造所+検体番号+実験施設番号+実験番号」が示してある。いくつか有意なばらつきが見られた結果もあるが、少なくとも良好な測定の再現性が確認されたものと考えられる。またワクチンに含まれるA/H3N2ウイルスのHA抗原量は、今回調べられた限りでは標準抗原と比べて同等以上であると考えられた。

B型についても同様の解析を行った。結果は図9と同様、図8に示した。B型の場合もA/H3N2型と同じく、多少測定値に有意なばらつきが見られることがあるが、実用的な範囲では良好な再現性が認められたものと考えられる。この場合A/H3N2型と異なり標準抗原と同等以上の結果を示したものが6ロットで、あとの5ロットは高い結果の得られた6ロット、あるいは標準抗原に比べて有意に低い結果であった。A/H1N1型についても同様の解析を試みたが、参照ワクチン、ワクチンロットとも反応が弱く、特に平行線定量法での検量範囲での測定値が得られていない可能性が考えられた。この原因として、1999-2000シーズン用ワクチンに含まれるA/H1N1型ウイルスのHA抗原量は他のA/H3N2型とB型と比較して少なく設定されていたこと、およびプレートに含まれる抗血清の力価が抗原濃度のわりには高かった可能性が考えられた。そこで再度抗血清および標準抗原の量を減らして測定し直した。最初の高い抗血清濃度を用いて高濃度の標準抗原に対して測定した結果をExp. 1、2回目の抗血清および標準抗原の濃度を減らした測定をExp. 2として、それぞれの測定結果を図8および9と同様に図10示した。Exp. 1とExp. 2では抗血清の濃度が異なること、標準抗原の濃度も異なる。従って抗血清の濃度の違いが相対力価に影響を及ぼさ

ないとすれば、Exp. 1とExp. 2の結果は標準抗原の濃度に対応した違いを示すと考えられる。しかし、図10に見られるように、低い測定値の得られた2検体については、Exp. 1とExp. 2の間に有意な違いが見られなかった。これらの検体では、1、2いずれの測定においても検量範囲の下限に近い測定値であったことから、条件を変えた測定においても同様な結果が出た事が原因である。他の検体ではExp. 1とExp. 2の結果に有意な違いが見られた。この違いは標準抗原の濃度の違いに対応しており、適当な検量範囲であれば測定、解析法ともに問題がなく、再現性の高い測定ができることを示している。

上記ワクチンロットについての測定値では、感染研とそれ以外の各施設の間での再現性しか確認できなかった。そこで全施設で共通に測定されている参照品の成績を用いて、全施設横断的に測定の再現性を検討した。まずA/H3N2型についての成績を図11に示す。図11では感染研で3回測定した標品Evagripについての結果も併せて示した。感染研での測定値には良好な再現性が認められた。また参照品の測定値についても、一部他と有意に異なる結果も見られたが、全体的にはかなり高い再現性が認められた。同様にB型の結果を図12に示す。やはりH3N2同様の良好な再現性が得られることが確認された。A/H1N1については、上述したように第一回目の測定で、標準抗原および抗血清の濃度に問題があった可能性が考えられ、条件を変えて再度測定したため、2回の測定結果が得られた。H1N1の2回分の結果をまとめて図13に示した。H1N1についても各々の条件毎ではそれぞれ施設間で大変良好な再現性が得られた。ワクチンロットの結果でも見られたように、Exp. 1とExp. 2では測定条件が異なることから異なった相対値を示している。

2000-2001シーズン用のワクチンについても、感染研と各事業所との間での測定値の比較を行ったが、おおむね良好な再現性が得られた。

SRID法と従来の力価測定法との関係

平成11年度までインフルエンザHAワクチンの力価についてはマウスを用いた免疫原性試

験によって行われてきた。SRID法は、ワクチンに含まれるHA抗原量を力価として測定するものであり、ワクチンの力価としては間接的な指標であることは否めない。そこで、従来法の力価とSRID法の力価についての関係を解析した。その結果、SRID法で参照ワクチンの力価よりも高いものは従来法の力価測定法でもほとんど全て参照ワクチン以上の成績であった。従って、SRID法を従来法の代替法として利用できることが示された。但し、解析した結果は2年間という限られた期間についてであり、ワクチンに選ばれるウイルス株によって異なる可能性も考慮しなければならない。また、ごく一部ではあるが両者に相関しない場合が認められているので、今後も何らかの方法でワクチンの免疫原性についてモニターする必要があると思われる。

D. 考察

今回の結果により、インフルエンザHAワクチンについてSRID試験を実施した場合、条件を厳密に制御するならば、同一検体については施設の違いを超えて高い再現性が得られることが確認された。ただA/H1N1型の結果より、測定条件が相対力価の測定値に大きく影響する可能性があることが示され、SRID試験の実施に当たっては厳密な条件の統一が重要であると考えられた。

結果の解析については、理論的には勾配比定量法が成立するものと考えられるが、実際のデータにはその前提条件を満たしていないと考えられるものが散見された。こうした事の原因について今後検討する必要があると思われる。

今回、SRID法で同一検体であれば再現性の高い結果が得られることが明らかになった。しかし試験結果に影響しうる様々な要因が考えられる。こうした要因には、先ず抗血清の特異性、即ち抗血清がHAに対する特異血清か、少なくとも抗HA抗体を主とするものであるかどうかと考えられる。血清の特異性は、SRID試験でHAの抗原量を測定する場合の重要な因子である。また抗原のホルマリン処理等による部分変性はゲル中での拡散に影響する可能性が

あり、SRD試験結果に重大な影響を与える可能性がある。また、2000-2001シーズン用ワクチンの標準抗原を設定する際に、A/EBN2型で同じウイルス株に由来するが異なる研究所で作製された高増殖性株がSRID試験法で同じ抗血清に対して異なる反応態度を示したことから、標準抗原の設定が力価に大きな影響を与えることがわかった。今回の結果はこうした要因についてすべて検討を行ったわけではないことから、今後、SRID試験結果と蛋白量との関係やその他必要な指標についてのモニター等により、SRID試験の有効性と限界について明らかにする努力が必要と考えられる。

今回の研究では、標準抗原や参照抗血清の作製についての検討を行っていない。今後、本試験法を国家検定に導入して運用する際には、これらについて前述した問題点を含めて検討を行う必要がある。

E. 結論

SRID法は、一定の条件の下では比較的短期間にインフルエンザワクチンの力価測定を再現性良く行うことができた。

F. 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).

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. 11th 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)

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

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

図 1

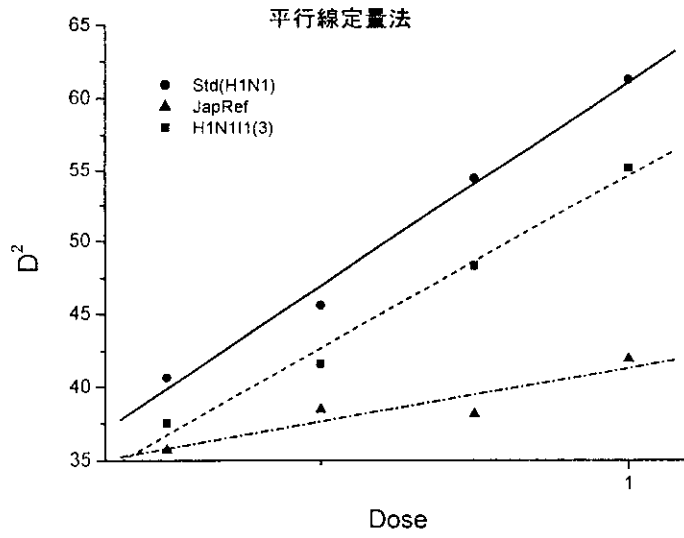


図 2

