

膜融合能にも影響を及ぼし、131 位、160 位及び 187 位のいずれか 2 ヶ所に糖鎖が付加されるとレセプター結合能と膜融合能は大きく低下し、3 ヶ所のすべてに導入されると双方の活性をほぼ完全に失うことが明らかになった。また、H2 分子の球状部に 2 本以上の糖鎖を付加すると、ヒト血清との反応性が低下し、抗原性が大きく変化することが明らかになった。これらの結果と、131 位、160 位及び 187 位に 2 本以上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、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き、これが 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。

#### E. 結論

A/H2N2 ウイルスの HA が、ヒトの世界での 11 年間の流行期間中に、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 位及び 187 位のいずれかに 1 本の糖鎖を獲得した HA 蛋白の膜融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膜融合能は著しく減弱し、3 本の糖鎖を獲得すると膜融合能をほぼ完全に失う。

2. H2 分子の 131 位、160 位及び 187 位のいずれかに 2~3 本の糖鎖を獲得するとヒト血清との反応性が低下し、抗原性が大きく変化することが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Li, Z-N., Hongo, S., Sugawara, K., Sugahara, K., Tsuchiya, E., Matsuzaki, Y., Nakamura, K. The sites for fatty acylation, phosphorylation and intermolecular disulphide bond formation of influenza C virus CM2 protein. *J. Gen. Virol.* 82: 1085-1093, 2001.

2) Sugahara, K., Hongo, S., Sugawara, K., Li, Z-N., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Matsuzaki, Y., Nakamura, K. Role of individual oligosaccharide chains in antigenic properties, intracellular transport, and biological activities of influenza C virus hemagglutinin-esterase protein. *Virology* 285: 153-164, 2001.

3) Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Li, Z-N., Nakamura, K. Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2475-2484, 2001.

4) Muyanga, J., Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Kimura, K., Mizuta, K., Ndumba, I., Muraki, Y., Tsuchiya, E., Hongo, S., Kasolo, F. C., Numazaki, Y., Nakamura, K. Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999. *Arch. Virol.* 146: 1667-1679, 2001.

5) Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Mizuta, K., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Hongo, S., Suzuki, H., Nakamura, K. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998. *J. Clin. Microbiol.* 40: 422-429, 2002.

6) Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Li, Z-N., Nakamura, K. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *J. Gen. Virol.* In press.

##### 2. 学会発表

1) 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 蛋白の生物活性におよぼす個々の糖鎖の影響 第 16 回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 沖縄 平成 13 年 1 月。

2) 本郷誠治、河野吉彦、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 NS 遺伝子産物の性状 第16回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 沖縄 平成13年1月.

ス学会学術集会 大阪 平成13年11月

3) 河野吉彦、本郷誠治、村木靖、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の NS1 と NS2 蛋白はウイルス粒子内に存在する 第55回 日本細菌学会東北支部総会 仙台 平成13年8月

4) 李柱男、本郷誠治、菅原勘悦、土屋恵美、村木靖、松寄葉子、中村喜代人 C型インフルエンザウイルスの第6遺伝子分節由来の P42 と M1' 蛋白の性状 第55回 日本細菌学会東北支部総会 仙台 平成13年8月

5) 松寄葉子、菅原勘悦、土屋恵美、村木靖、本郷誠治、中村喜代人、水田克巳、西村秀一、永井幸夫、鈴木宏 宮城県における10年間のC型インフルエンザウイルス分離状況 第55回 日本細菌学会東北支部総会 仙台 平成13年8月

6) 土屋恵美、菅原勘悦、松寄葉子、李柱男、村木靖、本郷誠治、中村喜代人 アジア型インフルエンザウイルスの HA はなぜ新たに糖鎖を獲得できなかったのか 第55回 日本細菌学会東北支部総会 仙台 平成13年8月

7) 土屋恵美、菅原勘悦、松寄葉子、李柱男、村木靖、本郷誠治、中村喜代人 アジア型インフルエンザウイルスの HA はなぜ糖鎖の数を増やすことができなかったか 第49回 日本ウイルス学会学術集会 大阪 平成13年11月

8) 松寄葉子、菅原勘悦、土屋恵美、村木靖、本郷誠治、中村喜代人、西村秀一、高尾信一、島田慎一、水田克巳 山形、宮城、埼玉、広島 の4県で同時期に分離されたC型インフルエンザウイルスの性状 第49回 日本ウイルス学会学術集会 大阪 平成13年11月

9) 李柱男、本郷誠治、菅原勘悦、土屋恵美、村木靖、松寄葉子、中村喜代人 C型インフルエンザウイルスの第6遺伝子分節に由来する P42 と M1' 蛋白の性状 第49回 日本ウイル

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

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

新型インフルエンザウイルスによるパンデミックで被る被害を最小限にとどめるためには、新型ウイルスの出現をいち早く捉え、それに対処する準備を速やかに開始しなければならない。このために我々は、ヒトのインフルエンザ株サーベイランスと並行して H5N1 など新型ウイルスとして重要なウイルスの流行時の連絡網、株の迅速入手手順、共同研究体制などの確立を試みた。また、トリ、ブタなど動物からのウイルス分離およびブタにおける H5、H9 ウイルスに対する定期的な抗体保有調査を前年度に引き続き行い、これらサーベイランスから得た分離株についてその性状を解析してウイルスバンクに保存し、新型ウイルスの出現時に速やかにワクチン製造株が供給できる準備を行った。また、H5、H9 ウイルスを用いたワクチンの力価測定システムの構築を行った。

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）

新藤奈邦子、多屋馨子、山下和予、岡部信彦（国立感染症研究所情報センター）

真瀬昌司（動物衛生研究所感染症研究部）

真田直子（小鳥の病院 BIRD HOUSE）

財団法人 細菌製剤協会

全国都道府県、政令指定都市衛生研究所

ウイルス出現時の危機管理体制の確立とそれに沿った準備が進められてきた。しかし、流行時の情報収集・連絡網や管轄が異なる省庁間での協力体制、ワクチン製造およびその検定のための製造所との協力体制、新型ウイルスの流行を捉えた時の行動計画など今後も補足、拡充していかなければならない問題点も残されている。本研究では、それらについて検証し、充実をはかることを目的としている。

A. 研究目的

1997年に香港で起こったトリ型インフルエンザウイルス H5N1 の流行とヒトへの感染が起こって以来、香港ではさらに 2001年、2002年と2度の H5N1 ウイルスの流行が起こった。しかし、1997年の経験と対応策がその後の流行対策に生かされ、いずれもヒトへの感染を起こすことなく1ヶ月以内で終息させることに成功している。

わが国では 1997年の香港事件を期に、新型

B. 研究方法

1. インフルエンザ流行株の入手および解析。

全国の地方衛生研究所（地衛研）から国立感染症研究所（感染研）情報センターの WISH-Net に報告されるウイルス分離数および初期抗原解析情報をもとにして、さらに詳細な抗原解析が必要と判断された株を入手し（総分離数の約 8%）、フェレット標準抗血清にて解析を行った。また、分離株の HA 遺伝子配列を決定し、系統樹を作成した。

2. H1～H15 亜型インフルエンザウイルスの系統保存。

地衛研で日本に飛来したカモの糞から分離したトリインフルエンザウイルスを入手し、前年度までに作製した全亜型に対するヤギ抗血清パネルを用いて亜型の同定を HI 試験にて行った。また、H5 ウイルス分離株については、HA 遺伝子解裂部位の塩基配列の決定を行い、強毒型か弱毒型かを推定した。さらに、孵化鶏卵接種により増殖性についても検討した。

3. ブタへの新型ウイルスの侵入監視。

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 H5、H9 ウイルスに対する抗体調査を行った。抗原としては、A/HK/9-1-1(H5N1)、A/HK/1093/99 (H9N2)、A/turkey/Wis/66 (H9N2)各不活化ウイルスを用い、抗体価は HI 試験にて測定した。

4. トリインフルエンザワクチンカ価測定試薬の作製。

トリインフルエンザウイルスを用いたワクチンを製造した場合に備えて、ワクチンカ価測定に用いる標準抗原、標準血清の作製を行った。用いたウイルス株は、A/HK/9-1-1(H5N1)、A/swine/HK/97(H9N2)である。大量培養したウイルスを濃縮精製し、HA 蛋白を単離してヤギに免疫して抗血清を作製した。

### C. 研究結果

1 わが国のインフルエンザ株サーベイランス。

昨年度に引き続き、感染研呼吸器系ウイルス室、情報センターおよび全国の地衛研との関係により、インフルエンザ患者情報やウイルス分離情報の収集およびそれに基づいて我々が収集した分離株の

抗原解析・遺伝子解析結果の還元など、情報収集・還元システムのコンピューターネットワークの充実、改良が行われた。

これらのシステムを駆使して行われた平成13年度(2000/01 シーズン)の株サーベイランスの結果、当該シーズンの流行は例年より遅く始まり、規模も小さかったこと、さらに、A/ソ連型(H1)、A/香港型(H3)、B型の混合流行であったことなどが明らかになった。また、夏場にも少数のB/Victoria系統のウイルスが分離され続けたことなどが特徴であった。これらの解析結果や諸外国の流行状況、さらには、WHOが推奨するワクチン株情報をもとにして、平成13年度は、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Panama/2007/99(H3N2)、B/Johannesberg/5/99がワクチン株に選定された。

上記ワクチン株選定に至った経緯や流行株解析情報は、シーズン終了後ただちにWISH-NETや情報センターから発信される病原微生物検出情報(IASR)などで関連協力機関および一般市民へ還元された。

2. インフルエンザ株サーベイランスにおける国際協力。

中国は新型インフルエンザウイルスの発祥の地として疫学上最も重要な国である。我々は中国における流行状況をいち早く捉え、さらに、有用なワクチン候補株を確保するために、米国CDCと分担して、中国インフルエンザセンターから4度にわたり計127株を入手した。また、東アジア地区の他の国としてはフィリピン、ベトナムからも臨床分離検体および分離株を入手し、それらの抗原解析および遺伝子解析を行った。その結果、2000/01シーズンの東アジア地区からの分離株もわが国の流行株と類似した性状であることが明らかになった。これらの成績は国内株の成績とあわせてWHOワクチン株選定会議で議論され、ワクチン推奨株の決定に役立てられた。また、分離

株の解析成績はそれぞれの国に速やかに還元され、東アジア地区のインフルエンザサーベイランスに役立てられた。このような国際貢献は、新型ウイルス発生時の共同研究の基盤として重要である。

### 3. 香港のトリ市場における H5N1 ウイルス流行時の対応。

2001 年 5 月中旬に香港のトリ市場で強毒型の H5N1 ウイルスの流行が起こり市場のニワトリが死に始めた。この情報は WHO 動物インフルエンザサーベイランスネットワークを通じて感染研の WHO インフルエンザ協力センター長のもとに入り、そこからただちに厚生労働省結核感染症課および感染研各関係者に伝えられた。この流行は 5 月末までにはヒトへの感染を起こすことなく終息した。

しかし、我々はヒトへの感染が起こった場合およびわが国への侵入の危険性が生じた場合に備えて、流行の進展状況や流行株の性状に関する情報を香港から逐一入手して、その対応に当たった。また、ワクチン製造が必要になった場合に備えて、原因ウイルスを入手する手続きを取った。しかし、H5N1 ウイルスは輸入禁止病原体のひとつであり、農林水産大臣の許可が必要で、認可されるまでには通常 1～3 ヶ月を要する。このことから、緊急時の迅速な対応ができるように厚生労働省結核感染症課、農林水産省畜産部衛生課および感染研の各関係者で協議し、緊急輸入体制を検討した。

一方、2002 年 2 月に再び香港のトリ市場で H5N1 ウイルスの流行が起こったが、流行規模が小さかったことから、今回は情報収集のみを行った。また、今回からは農水省との情報共有化が積極的に進められ、流行状況は随時厚生労働省結核感染症課を通じて農水省にも報告された。

### 4. 動物インフルエンザウイルスの系統保存と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充実。

Pandemic 発生時には流行ウイルスに抗原性が類似したワクチン製造株を速やかに決定し、各ワクチン製造所に供給して、ワクチン製造を速やかに開始させる必要がある。我々は、どの亜型の新型ウイルスが出現しても対応できるように、全ての亜型のトリウイルスを系統的に保存し、それらウイルスの HA および NA の亜型同定を行うとともに、それらの感染価を測定してワクチン製造に適した高増殖株の選択を行った。また、日本に飛来したカモから地衛研によって分離された H5 ウイルスを含む 12 株 (H2-4 株、H3-2 株、H4-3 株、H5-3 株) についても性状解析を行った。さらに、動物衛生研究所で輸入愛玩鳥から分離した H9N2 ウイルス 2 株とそれらに対する免疫抗血清を入手し、それらの詳細な抗原解析、孵化鶏卵における増殖性の検討を行ない系統保存バンクに加えた。

日本においても輸入愛玩鳥の病鳥から H9 ウイルスが分離されたことから、動物衛生研究所と協力定点のペットクリニックおよび感染研との共同研究として、今後も輸入鳥からのウイルス分離を継続する予定である。

### 5. トリ型インフルエンザワクチンの力価測定系の確立。

ヒトのインフルエンザワクチンと同様にトリインフルエンザウイルスを用いたワクチンにおいても、現行の生物製剤基準に準拠した力価測定が必要である。現行のワクチン力価測定は一元免疫拡散法 (SRID 法) で行われているが、これには標準抗原と HA 蛋白に特異的な抗体などの試薬が必要である。これら試薬作製には大量の精製ウイルスが必要であることから、我々は厚生労働省監視指導課、農水省畜産部さらには感染研検定協議会の了承のもとに、協力の得られた 2 社のワクチン製造所に H5 および H9 ウイルスの大量精製を委託し、力価測定用試薬を作製した。現在、これら試薬の特異性や反応性

など測定系の検討を行っている。

#### 6. ブタへのトリインフルエンザウイルスの侵入監視。

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。従って、新型ウイルスの候補として重要な H5 や H9 ウイルスが日本のブタへ侵入しているのか否かを継続的に監視する必要がある。そこで我々は、わが国のブタがトリインフルエンザ H5、H9 ウイルスに感染しているのか否かを昨年度に引き続き全国 28 地区の地衛研の協力のもとに 2230 頭のブタについて、上記 2 亜型ウイルスに対する抗体調査を行った。その結果、H5N1 ウイルスおよび A/turkey/Wisconsin/66 (H9N2) ウイルスに対しては全てのブタは陰性であることが分かった。一方、A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) に対しては広島県の 1 頭のブタで HI 価 10 倍の抗体が検出され、その結果は感染研においても追証された。しかし、HI 試験に七面鳥血球を用いると抗体価は陰性となること、H9 ウイルスは広島県からは分離されていないこと、さらに同地区のファームから同時期に集められた 79 匹のブタはすべて抗体陰性であったことなどから、この陽性例は抗体検出系の問題と思われた。

#### D. 考察

新型インフルエンザウイルスによるパンデミック発生時には、原因ウイルスの検出、伝播状況に関する情報を国内外からすばやく入手する情報網をもつことが重要である。さらに原因ウイルスの性状に関する情報のみならず、ワクチン製造に備えてそれを緊急に入手（輸入）する段取りを事前におこななければならない。しかし、新型ウイルスは恐らく動物（トリ）ウイルスから由来し、その多くは中国など海外で発生することが予想され

ることから、その迅速な入手には農水省の協力が不可欠である。そこで、今年度初めて農水省、動物衛研、厚労省、感染研関係者で連絡会をもち、相互の情報交換、およびウイルスや抗体の相互供与などについて協議された。これによって、2001 年の香港での H5N1 の流行の際の株の緊急輸入や、動物衛研が日本で分離した H9N2 ウイルスの感染研の系統保存バンクへのスムーズな登録が可能になった。今後も動物インフルエンザウイルスの流行の際や、それによる Pandemic 発生の際は、これら機関の間での協力関係がうまく機能するものと確信している。

1997 年の香港での H5N1 ウイルス流行騒動の際は、わが国でも弱毒型 H5N1 ウイルスを作製し試作ワクチンを作製したが、その力価検定に用いた試薬は英国の NIBSC から分与された。パンデミックによる緊急時にはワクチンや検定試薬が入手できるとは限らないことから、新型ウイルス候補と考えられる重要なウイルスについては事前に検定試薬を準備しておくべきである。検定試薬の作製にはワクチン製造所の協力が必要であり、それらへのウイルス分与手順、試薬作製に要する時間、製造所内でのヒトウイルスと動物ウイルスとの交叉汚染の危険性、施設外への漏出防止策など事前に検討すべき課題があった。そこで、今回は試験的に弱毒型の H5、H9 ウイルスを 2 製造所に委託して、それぞれの問題点について検討したが、特に問題は見られなかった。作製された試薬を用いた検定システムについては今後の検討を要するが、次年度以降も別の亜型ウイルスについて順次作製していく必要がある。

新型ウイルスがブタの世界へ侵入しているのか否かを調査することは、それがヒトの世界へ進出してくる可能性を予想するうえで重要な作業である。このために我々と感染研情報センター、地衛研が協力して H5、H9 ウイルスに対するブタでの抗体調査を行ってきた。これまで、これらウイルスに対する抗体陽性例はなかったが（平成 10

年度に島根県で H5 ウイルスに抗体陽性と判定されたブタ血清は、感染研での再検の結果、陰性と判定された)、今回は再検においても H9 ウイルスに陽性である検体が 1 例見つかった。いろいろな状況証拠から H9 ウイルスへの感染とは考えにくく、また、ブタの間に常在して感染している H1 や H3 ウイルスに対する抗体への交叉反応の可能性など抗体検出法の検討を要するものの、もし H5 や H9 ウイルスが本当に感染してそのファーム周辺に広がっていた場合も想定して、今後はその対応策を関係者間で早急に検討しておく必要がある。

## E. 研究発表

### 1 論文発表

1. Odagiri, T., Kariwa, H., and Ohara, Y. : The influenza B virus BM2 protein may be involved in the ribonucleoprotein complexes through the binding with membrane protein M1. International Congress Series 1219, 411-419 (2001)

2. Obuchi, M., Odagiri, T., Asakura, K. and Ohara, Y.: Association of L\* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus with microtubules in infected cells. Virology 289 95-102 (2001)

3. 小田切 孝人: インフルエンザワクチン株とワクチンの効果, MEDICO 32, 321-325 (2001)

4. 小田切 孝人: インフルエンザウイルス株サーベイランスの現状と問題点 インフルエンザ 3, 45-52 (2002)

### 2 学会発表

1 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、渡邊真治、今井正樹、倉根一郎、田代真人。200/2001 シーズンのインフルエンザの流行状況。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。

2 西藤岳彦、小田切孝人、田代真人。B 型インフルエンザウイルス HA 遺伝子の分子進化。第 49

回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。

3 今井正樹、渡邊真治、小田切孝人。B 型インフルエンザウイルス NS2 蛋白の性状。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、11 月 (2001)。

4 Masaki Imai, Shinji Watanabe and Takato Odagiri. The influenza B virus NS2 protein is involved in the ribonucleoprotein complexes by direct binding with nucleoprotein. Research Conference on Orthomyxoviruses, Texel, The Netherlands, November (2001).

5 Sinji Watanabe, Masaki Imai and Takato Odagiri. Cytoplasmic transport of the influenza B virus BM2 protein. Research Conference on Orthomyxo-viruses, Texel, The Netherlands, November (2001).

6 今井正樹、渡邊真治、小田切孝人。B 型インフルエンザウイルス NS2 蛋白の性状。第 24 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2001)。

7 渡邊真治、今井正樹、小田切孝人。B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白質の細胞内輸送。第 24 回日本分子生物学会年会、横浜 (2001)。

8 Takato Odagiri, Shinji Watanabe and Masaki Imai : Molecular characterizations of the small viral products of influenza B virus. 6<sup>th</sup> Annual Meeting of US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. New Orleans, February 14-15 (2002)

## F. 知的所有権の取得状況

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（新潟大学大学院医歯学総合研究科

国際感染医学講座公衆衛生学分野）

共同研究者： 斎藤 玲子、押谷 仁、坂井 貴胤（同上）

**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。我々は 1999/2000 年と 2000/2001 年、新潟県内小児科外来のインフルエンザ患者で PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)法及び TCID<sub>50</sub> 法を用い 1)市中株でのアマンタジン耐性株の動向、2)小児に投与した際の耐性株の発生頻度およびサブタイプによる特徴を検討した。

1)市中株(Am 投与前)耐性株頻度は 1999/2000 年 3.4% (6/179)、2000/01 年 0.0% (0/77)であった。Am(-)と(+)の TCID<sub>50</sub> 力価差の時系列的検討で、1999/2000 年は流行と連動して Am(+)力価が上昇し、より耐性株が出現しやすい状況を呈したが、2000/01 年の上昇は軽微であり、Am の処方量の増減と関連すると思われた。

2)Am 投与後の耐性株出現頻度は、型別では H1N1 で 20%(9/45)、H3N2 で 33.3%(22/66)と H3N2 が高い傾向が 2 シーズンを通じてみられた。M2 蛋白のアミノ酸変異部位は、H1N1 では Val-27-Ala が、H3N2 では Ser-31-Asn 優位であった。

## 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 万人分と毎年倍量処方されていたが、2000/01 年はイン

フルエンザ流行が小規模化であったこと、ノイラミニダーゼ阻害剤が保健適応となったことから処方量は 70 万人分と減少した。しかし、このような無秩序な使用は、諸外国に比して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・治療対策への影響は重要である。

本研究では TCID<sub>50</sub>/0.2ml 法と PCR-RFLP 法を用い、1)市中株のモニターとして Am 投与前耐性株の動向、2)小児に投与した際の耐性株の発生頻度およびサブタイプによる特徴を検討した

## B. 研究方法

### 1) 対象

1999/2000 年および 2000/01 年シーズン中、新潟市近郊の小児科医院を発症 48 時間以内に受診した A 型インフルエンザ様疾患患児で、インフルエンザ迅速診断法(Directigen™ Flu A, 日本ベクソンディッキンソン)により A 型インフルエンザ



感染が確認された患児を対象とした。初シーズンは 200 名、次シーズンは 76 名を調査した。医師より薬剤の作用・副作用、研究の目的について本人・及び保護者にインフォームドコンセントを得た後、同意した群にアマンタジンを 3 日間、5mg/kg/日（最大 100mg/日）を投与し、Am 投与前(初診時)、三日毎の再診、再々診時に咽頭ぬぐい液を採取した。

## 2) 実験室的方法

耐性株の判定は PCR-RFLP、TCID<sub>50</sub> 法併せて行い耐性株と判定された株はすべて 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。

### a. PCR-RFLP 法

患者咽頭ぬぐい液 100 $\mu$  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 M2 蛋白膜通過部位の 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(BspLulI 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。

### b. TCID<sub>50</sub> 法

咽頭ぬぐい液を 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 2.0 $\mu$ g/ml アマンタジン入りと無しの 3 列の希釈列を作り、TCID<sub>50</sub> 法による力価差が 2.0 未満の株は耐性と判定した。

## C. 研究結果

### 1) 市中株

Am 投与前(初診時)検体を市中株として TCID<sub>50</sub> 法でアマンタジン入り(+)と無し(-)の希釈列の力価を比較した。1999/2000 年シーズンはインフルエンザ流行に伴って Am(-)の希釈列の力価は変化しないにもかかわらず、インフルエンザ患者増加と共に Am(+)の希釈列の力価は上昇し、患者のピークに 3 週間遅れて力価もピークに達した。なお、このシーズン中 Am 投与前検体から 3.4%(6/179)に耐性株の出現を認めた。

2000/01 年シーズンは前シーズンに比してアマンタジン(+)の力価の上昇は軽度であった。また、アマンタジン投与前の検体から耐性株は認められなかった(0/80)。

### 2) アマンタジン投与後耐性株出現頻度

アマンタジン投与後、1999/2000 年シーズンは 29.6%(24/81)に、2000/2001 年シーズンは 23.3%(7/30)の患児で耐性株が出現した。サブタイプ別には H1N1 で 2 シーズンを通じて H3N2 より耐性株出現頻度が低く、それぞれ 20.0%(9/45)、33.3%(22/66)であった。また、M2 蛋白膜通過部位のアミノ酸変異にもサブタイプで違いが見られ、H1N1 では Val-27-Ala が優位で、Ser-31 -Asn は少なく、Ala-30-Val はなかった。一方 H3N2 では Ser-31-Asn が有意であった。

## D. 考察

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 蛋白部分のシークエ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 番変異耐性株を検出し大量検体のスクリーニングに用いている。

欧米では Am 投与後の患者約 1/3 に耐性株が出現すると言われている。本邦では 1998 年末、抗 A 型インフルエンザ治療剤として認可後、処方量は爆発的に増え、1999/2000 年シーズンはインフルエンザ患者の約 1/3 (2.1 万)が投与を受けたと推定される。このように大量にもかかわらず本邦で耐性株に関する調査報告は少なく、われわれは市中株でのアマンタジン耐性株の増加を懸念していたが、結果的には 1999/2000 年シーズンは 3.4%みられたものの、70 万人に使用された 2000/01 年シーズンでは耐性株の出現はなかった。このような大量使用後も市中株でアマンタジン耐性株の増加傾向はみられないことから、副作

用や腎機能低下者での処方量など個々の患者での注意点を考慮して使用すれば、耐性株に関してはアマンタジン規制を支持する事象はなかった。

また、サブタイプ別に解析すると、耐性株出現頻度、アミノ酸変異部位に差が見られ、文献的にもこの点に関しては報告が少なく、例数を増やし今後も検討を重ねる必要がある。

われわれは、これまでアマンタジン投与後の易耐性化について報告してきたが、新型インフルエンザ出現の際し、安価・化学的安定な薬剤としてのアマンタジンの役割は大きく、本研究は大量使用の際の影響を見た点で公衆衛生学的価値は大きい。

ノイラミニダーゼ阻害剤の認可で、あらたな耐性ウイルスの出現も危惧され、抗ウイルス剤耐性株のモニターはますます重要性を増しており、サーベイランスシステムの整備が望まれる。

## E. 結語

本邦での大量に使用にもかかわらず、耐性株の市中での増加傾向は小さく、副作用や腎機能低下者に対する注意点を踏まえれば、当該薬剤使用を積極的に制限する必要はないと思われた。また、投与後の耐性株出現頻度にはサブタイプで違いが見られ今後の検討を要する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. R.Saito, H.Oshitani, H.Masuda, H.Suzuki. Detection of amantadine-resistant influenza A strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 40:84-88, 2002
2. H.Suzuki, R.Saito, H.Oshitani. Excess amantadine use and resistant viruses. *Lancet* 358:1910, 2001.
3. R.Saito, H.Suzuki, H.Oshitani, T.Sakai, N. Seki, N. Tanabe. Efficacy of influenza vaccine against influenza A(H3N2) infections in nursing homes in Niigata, Japan, during the 1988-99 and 1999-2000 seasons. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23: 2002 (in press)

4. 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、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。チャイルド・ヘルス。44: 41-44, 2001.
  5. 斎藤玲子、押谷仁、鈴木宏。アマンタジン耐性インフルエンザウイルス。特に本邦のアマンタジン耐性株出現状況。臨床検査。45: 884-887, 2001.
  6. 鈴木宏、斎藤玲子、田邊直仁、関奈緒、坂井貴胤。高齢者インフルエンザ感染の予防と治療。日陶。60: 1006-1014, 2001.
  7. 鈴木宏、斎藤玲子、坂井貴胤。抗インフルエンザウイルス薬の現状と課題。臨床検査。46: 179-182, 2002.
2. 学会発表
1. 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、内山聖、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：特に耐性株に注目して。第104回日本小児科学会学術集会（仙台）、2001.
  2. 斎藤玲子、増田寛樹、坂井貴胤、佐藤勇、押谷仁、西川眞、鈴木宏。アマンタジン投与後の耐性A型インフルエンザ株の易出現性と市中耐性株の動向。第49回日本ウイルス学会学術集会・総会（大阪）、2001.
  3. 坂井貴胤、斎藤玲子、増田寛樹、佐藤勇、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49回日本ウイルス学会学術集会・総会（大阪）、2001.
  4. 斎藤玲子。薬剤耐性ウイルスの出現状況。第50回日本感染症学会・第48回日本化療学会（東京）。2001.
  5. Saito, R., Sakai, T., Suzuki, H. Amantadine resistant influenza viruses and their subtype distribution in the community. 6<sup>th</sup> annual meeting, US- Japan Cooperative Medical Science Program. Acute respiratory infections (ARI) panel. 2002. Jan. 14-15<sup>th</sup>. New Orleans, Louisiana.

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

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 金沢大学大学院医学系研究科 助教授

インフルエンザウイルス A/WSN 株及び種々の変異を導入した NS1 蛋白を *in vitro* の翻訳系に添加して翻訳調節機能を解析した。NS1 蛋白の活性に必要な領域、リン酸化の活性に於ける機能を明らかにした。151 残基からなる NS1 と CAT レポーター遺伝子との融合蛋白を発現する遺伝子組換えウイルスに加えて、新たに 131 残基からなる NS1 と CAT レポーター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て性状を比較したところ、温度感受性に違いが見られた。CAT 遺伝子を結核菌 Antigen85A 遺伝子に置き換えたウイルスを作成したところ、ウイルスの複製と遺伝子の安定性に於ける GC 頻度の重要性が明らかとなった。

#### A. 研究目的

遺伝子組換えによりウイルスの病原性と弱毒化の分子機構を明らかにし、弱毒ワクチン開発技術を得る事を目的とする。そのために、本研究では以下の課題を検討する。1) ウイルス因子として NS1 蛋白に焦点を絞り、ウイルスの病原性と弱毒化機構、関与する細胞因子の同定を行う。2) 弱毒ワクチン株、及び種々の抗原を発現する弱毒ワクチンベクターとしての利用を検討する。

NS1 蛋白変異ウイルスの解析はすでに昨年度までに *in vivo* で行ったので、*in vitro* でより詳細な分子機構の解析を行う。また、NS1 蛋白の活性へのリン酸化の影響を検討する。

インフルエンザウイルス NS1 蛋白変異ウイルスの弱毒ワクチン株としてのマウスを用いた免疫学的解析はすでに昨年度までに行った。そこで、NS1 遺伝子を弱毒ワクチンベクターとして利用するため、NS1 遺伝子内の挿入部位を変えて CAT レポーター遺伝子を挿入してウイルスの性状を比較検討する。挿入する抗原遺伝子として、CAT レポーター遺伝子の次の段階として、結核ワクチンへの応用を目的として、結核菌 Antigen85A 遺伝子を検討する。

#### B. 研究方法

WSN 株 NS1 蛋白 (230 残基) に加え、N 端 110 残基 (N110)、C 端 190 残基 (C190)、及び 66-

77 残基目の欠損 (dl12) 蛋白を GST との融合蛋白として発現しグルタチオンセファロースを利用してアフィニティー精製、GST はスロンピンで切断除去し NS1 蛋白を単離した。NS1 蛋白は A キナーゼ、C キナーゼ、及び G キナーゼを用いてリン酸化した。ウサギ網状赤血球ライセートにウイルス感染細胞からオリゴ dT セルロースを用いて精製した mRNA を添加、*in vitro* の翻訳に於ける NS1 蛋白の機能を解析した。発現蛋白は免疫沈降と PAGE により解析した。

インフルエンザウイルス A 型の遺伝子組換えは RNaseH 法を用いた。ウイルスの NS ゲノムは、昨年度報告した NS1 の N 端側 151 残基 [NS(151)2ACAT] に加え N 端側 131 残基 [NS(131)2ACAT] 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 遺伝子を挿入し作成した。CAT 遺伝子を Antigen85A 遺伝子に置き換えたウイルスも作成した。ウイルスの性状は MDBK 細胞を用いて解析した。

(倫理面への配慮) 当該遺伝子組み換え実験は金沢大学 DNA 組換え実験安全委員会の許可を得て行った。

#### C. 研究結果

1) 野生型 NS1 蛋白は *in vitro* 翻訳系で NP と M1 の翻訳を強く促進し、NS1 蛋白の翻訳は弱く促

進した。A-, C-, G-, いずれのキナーゼも NS1 蛋白をリン酸化したが、リン酸化により NS1 の翻訳促進活性は有意に増加した。N110-NS1 蛋白は *in vivo* では翻訳促進活性は欠損していたにもかかわらず、*in vitro* では翻訳促進活性が確認された。これは、この蛋白は 138-147 残基目に存在する核外輸送シグナル (NES) を欠損して、感染細胞内では核内に蓄積するために、翻訳の場である細胞質に存在しないためによるものと考えられた。一方、C190-NS1 蛋白は翻訳促進活性が欠損していた。これは、19-36 残基目に存在する RNA 結合領域を欠損するためと考えられた。しかし、この蛋白の添加量を増加させても翻訳の阻害は確認されず、dl12 温度感受性変異ウイルスが致死温度で翻訳を阻害する機構のモデルとはならなかった。一方、温度性感受性変異の dl12 蛋白は、*in vitro* 翻訳系の反応温度 30℃では予想されるように、野生型の NS1 蛋白と同様の活性を示した。

2) NS(151)2ACAT ウイルスは温度感受性となり、40℃では致死性となったのに対して、NS(131)2ACAT ウイルスは温度感受性とはならず、40℃でも 34℃と同程度の増殖性を示した。両ウイルスの 34℃での増殖性と CAT 蛋白の発現に違いは見られなかった。次に、Antigen85A 遺伝子は GC 頻度が高くそのままウイルスに挿入すると増殖が阻害され、挿入遺伝子の安定性も悪かったので、アミノ酸配列を変えずに人工的に GC 頻度を下げた遺伝子を合成してウイルスに挿入した所、ウイルスの増殖性や挿入遺伝子の安定性が格段に改善された。

#### D. 考察

1) NS1 蛋白は翻訳促進活性を持つ。NS1 蛋白のリン酸化は、活性に必須ではないが重要である。翻訳促進活性には RNA 結合領域が必須で、N 端 110 残基に翻訳促進活性に必要なすべての機能領域が存在する。mRNA の 5'-UTR の配列の違いが活性調節に重要であると考えられる。今後は、当該領域の検証、特に NP の mRNA の 5'-UTR に存在するユニークな stem-loop 構造の機能、並びに、これらに結合する細胞因子、翻訳開始因子の同定が重要である。

2) インフルエンザウイルス NS1 遺伝子を利用

したベクターとして、当該研究成果により、温度感受性と非感受性の 2 種類を使い分ける事が可能となった。NS(151)CAT ウイルスが温度感受性となる機構は、当該変異蛋白が核外輸送シグナルを持つのに対し、NS(131)CAT ウイルスは待たないことから、変異蛋白が細胞質に輸送されて、高温でなんらかの阻害活性を持つものと考えられるが、翻訳や蛋白の安定性には影響を与えなかったため、その機構はいまだ不明である。人にワクチンベクターとして利用するには温度感受性ベクターが安全性も高く有用と考えられる。当該ベクター系に結核菌抗原遺伝子を挿入したが、GC 頻度をさげることにより挿入遺伝子の安定性やウイルスの増殖性が格段に改善されたので、GC 頻度の高い他のウイルスや真核細胞遺伝子を挿入する際には人工的に GC 頻度を下げた合成 DNA を利用することが必須である。今後はさらに、免疫学的解析と実用化へ向けた研究を行いたい。

#### E. 結論

NS1 蛋白は細胞の翻訳開始因子と共同作用して翻訳調節を行っていると考えられる。NS1 蛋白の変異によるウイルスの弱毒化の分子機構の一部は以上の観点から説明される。NS1 遺伝子に種々の抗原遺伝子を挿入することにより、温度感受性弱毒ワクチン株として利用する事が可能となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takasuka N, Enami M, Itamura S, Takemori T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. *Vaccine* 20, 1579-1585, 2002.

2) M. Enami. Reverse genetics. *Vaccine*, in press.

##### 2. 学会発表

1) 郭潮潭、榎並正芳。インフルエンザウイルス NS1 蛋白による翻訳調節の *in vitro* 翻訳系を用いた解析。第 49 回日本ウイルス学会学術集会総会、2001 年 11 月、大阪。

## インフルエンザウイルス感染症の迅速診断、QuickVue Influenza Test 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型とB型のインフルエンザウイルスが検出可能な、免疫クロマト法による迅速診断キット、QuickVue Influenza Test (QUIDEL, USA) について検討した。対象は、2001年1月から3月のインフルエンザ様疾患の患者で、鼻腔吸引液 184 検体、鼻腔ぬぐい液 140 検体、咽頭ぬぐい液 101 検体を採取した。ウイルス分離陽性 204 検体中、QuickVue 陽性は 179 検体、ウイルス分離陰性 221 検体中 QuickVue 陰性は 203 検体で、ウイルス分離との比較で、本キットの感度は 87.7%、特異度は 91.9%となった。検体毎の感度は、鼻腔吸引液で 92.6%、鼻腔スワブで 83.7%、咽頭ぬぐい液で 76.5%と、これまでの酵素免疫法による迅速診断キットによる結果と同様な傾向を示した。本キットとインフルエンザ OIA との比較では、陽性と陰性の判定は 84.2%が一致し、全体では同等の感度、特異度であった。大きな特徴は簡便性に優れている点であった。A型とB型の型別はできないが、2つのウイルスを同時に検出できることから、外来治療におけるノイラミニダーゼ阻害剤の投与に際しての補助診断として有用である。

### A. 研究目的

インフルエンザといえば学級閉鎖、休校が、冬季の話題となってきたが、1994年の学童集団接種の中止以降、高齢者施設でのインフルエンザ死亡例が報道されるようになった。1997年には香港でH5N1インフルエンザが出現し、30%以上の高い死亡率が報告され、新型インフルエンザが流行すれば、日本でも多数の死亡者がでる可能性が厚生省の検討会で明らかにされた。さらに1999年初頭のシドニーインフルエンザ流行では、各地で救急車の記録的な出動回数、レスピレーター不足などが話題となり、日本国民もインフルエンザが、単なる感冒ではなく生命に関わる疾患であることを認識するようになった。以上のような経緯から、高齢者の

インフルエンザワクチン一部公費負担による接種が開始された。一方、脳炎脳症の多発から、乳幼児のインフルエンザ予防対策も急務となっている。

最近の数年間で、日本のインフルエンザの診断治療は急速に進歩して、世界のトップクラスとなった。まさに「インフルエンザ診療の革命」である。世界に先駆けて、インフルエンザ迅速診断は、日本の病院やクリニックの冬のルーチン検査となった。インフルエンザ迅速診断は、単に診断目的に有用だったのではなく、医師のインフルエンザの認識を完全に改めた点に真の意義があった。迅速診断の普及に伴い、日本の医師にとって、インフルエンザは単なる「かぜ」から、「インフルエンザウイルス感染症」

に変貌した。インフルエンザにより多数の人が入院し死亡していることを医師は実感し、これが急速な抗インフルエンザ薬の普及、ワクチン接種率の上昇につながった。

インフルエンザは、臨床的にインフルエンザ様疾患として、単に鎮咳剤、解熱剤等を投与する時代は終わり、外来やベッドサイドで迅速診断を実施し、抗ウイルス剤で治療する疾患となった。インフルエンザの診断に関しては、ここ数年で大きな変貌を遂げている。1999年にA型インフルエンザに対する迅速診断キットが発売され、次いでA、B型インフルエンザウイルス検出キットも発売された。現在では数種類のキットが発売されている。治療では、1998年にA型インフルエンザに対するアマンタジンの適応も認められ、2001年からはノイラミニダーゼ阻害剤であるザナミビル、オセルタミビルの発売により、A型、B型インフルエンザに対する治療が可能となった。このような状況のなかで、2つのタイプのインフルエンザウイルスが検出可能な迅速診断の必要性、重要性は従来にも増して高まっているといえる。

今回、免疫クロマト法を用い、A型とB型のインフルエンザウイルスを検出する迅速診断キット QuickVue Influenza Test (Quidel Corp. USA: 以下 QV) を、2000/2001のインフルエンザシーズンに使用し、ウイルス分離、nested RT-PCR、他のインフルエンザウイルス迅速診断キットとの比較検討を行った。

## B. 研究方法

2001年1月から3月の間に小児科および内科を、インフルエンザ様症状で受診した外来および入院患者から、鼻咽頭吸引液 184 検体、

鼻腔ぬぐい液 140 検体、咽頭ぬぐい液 101 検体の計 425 検体を採取した。

比較検査として QV と同じく、A 型、B 型を検出する Optical immunoassay によるインフルエンザ OIA (第一化学薬品: 以下 OIA)、ウイルス分離を行った。迅速診断キット陽性、ウイルス分離陰性の検体については、nested RT-PCR による確認を行った。

OIA 用検体を綿棒にとり、残りを 2~4 ml のウイルス輸送培地 (0.5%ゼラチン加リン酸緩衝液) で溶解した。このうち 0.3ml を QV に使用し、残りをウイルス分離および PCR 用として凍結保存した。鼻腔ぬぐい液は、金属製のフレキシブルなシャフトのダクロン綿棒 (栄研) を用いて、鼻腔粘膜を十分に擦過して 3 本採取し、2 本を迅速診断用とした。もう 1 本のスワブは、2ml の輸送培地中で十分に撈拌して、ウイルス分離用検体として凍結した。咽頭ぬぐい液も、同じ綿棒を用いて咽頭粘膜を十分に擦過して 3 本採取し、2 本を迅速診断用とした。もう 1 本のスワブは、鼻腔ぬぐい液と同様にウイルス分離用検体として処理した。

ウイルス分離は、-70℃に凍結した検体を解凍して、MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞あるいは CaCo 2 細胞を用い、細胞変性効果を確認し、特異抗血清により同定した。Nested RT-PCR は、プライマーをインフルエンザウイルス HA (Hemagglutinin) 遺伝子に設定して行った。

QuickVue Influenza Test は、A 型および B 型インフルエンザの核蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を用いた免疫クロマト法による、インフルエンザ迅速診断キットである。反応試薬チューブで反応試薬溶解液 (生理食塩

水)により処理された検体は、毛細管現象によりテストストリップ内を上部に移動するが、A型あるいはB型インフルエンザウイルス抗原がある場合には、着色粒子結合抗インフルエンザウイルス抗体に捕捉されて複合体を形成し、さらに、抗インフルエンザウイルス抗体が含まれる判定ラインの部分で再度捕捉され、免疫複合体を形成して着色がみられる。その上部にはコントロール蛋白に対する抗体が含まれる部分があり、そこでコントロール蛋白が捕捉されて複合体を形成し、コントロールラインの着色がみられる。

操作は、はじめに反応試薬溶解液を反応試薬チューブに入れ、この中に、採取した検体を加えた。次に、テストストリップを反応試薬チューブに入れ、10分間静置した。10分後にテストストリップの目視判定を行い、コントロールラインのみ認める場合を陰性とし、コントロールラインと判定ラインの両方が認められる場合を陽性とした。

### C. 研究結果

迅速診断キットで判定した425検体について検討した。ウイルス分離陽性は204検体で、Aソ連型91株、A香港型20株、B型93株であった。ウイルス分離陰性は221検体で、このうち迅速診断陽性の検体から、PCRによりAソ連型2株、A香港型2株、B型7株が検出された。

全検体のQVによる判定結果をウイルス分離と比較すると、感度87.7% (179/204)、特異度91.9% (203/221)であった。PCRの結果で補正すると感度は87.4% (188/215)、特異度95.7% (201/210)となった。A型、B

型それぞれの感度は、A型が83.8% (93/111)、B型が92.5% (86/93)、A型の亜型別では、Aソ連型とA香港型の感度は83.5% (76/91)と85.0% (17/20)で、それぞれの感度に有意差は認められなかった。検体別の感度、特異度は、鼻腔吸引液で92.6% (112/121)、88.9% (56/63)、鼻腔ぬぐい液で83.7% (41/49)、92.3% (84/91)、咽頭ぬぐい液で76.5% (26/34)、94.0% (63/67)であった。

同じ検体のOIAによる判定結果をウイルス分離と比較すると、感度81.9% (167/204)、特異度86.0% (190/221)で、PCRの結果で補正すると、感度は81.4% (175/215)、特異度は89.0% (187/210)となった。

両キットの陽性と陰性の判定は84.2% (358/425)が一致した。両キットの成績を比較すると、咽頭ぬぐい液でのB型の感度 ( $p=0.031$ )、特異度 ( $p=0.033$ )、一致率 ( $p=0.041$ )についてのみ有意差が認められ、いずれもQVが高値であった。

### D. 考察

2000/2001シーズンは、A香港型、Aソ連型、B型が混在して流行したが、1998/1999シーズンにも前半はA香港型、後半はB型が混合流行したように、我が国でのインフルエンザの流行は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様に重要で、入院となることも少なくないため、A型と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有用性が高いことは、これまでのインフルエンザ迅速検出キットの使用経験からも明らかであった。QVのA型、B型の

感度に有意差は見られず ( $p=0.059$ )、流行期を通して一定の検査精度が期待できるものと思われる。

QV と OIA との比較では、鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液での感度、特異度、陽性反応的中率、陰性反応的中率、一致率は、いずれも両者の間に有意差はみられなかった。咽頭ぬぐい液のみ、QV での B 型に対する感度、特異度、一致率が高く、有意差を認めたが、咽頭ぬぐい液の検体数が少なく、それぞれを別の綿棒で検査しているため、検体が同一ではないことも影響している可能性があり、検体数を増やして再度検討が必要である。

QV、OIA とともに鼻腔吸引液での感度が最も高く、咽頭ぬぐい液での感度は低い結果となり、酵素免疫法での結果と同様の傾向を示した。

これまでの成人におけるインフルエンザウイルス迅速診断の報告では、咽頭ぬぐい液が用いられている。今回の検討では、16 歳以上の内科患者の鼻腔吸引液 29 検体と、鼻腔ぬぐい液 5 検体が含まれていたが、鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液を併せての感度は、小児 (16 歳未満) で 88.6% (124/140) に比べて、16 歳以上では 90.0% (27/30) となり、成人でも高い感度が示された。咽頭ぬぐい液での感度 (76.5%) と比べても高く、成人でも鼻腔吸引液あるいは、鼻腔ぬぐい液を検体に用いることによってより検出率が高くなる可能性が示唆された。

QV では、早いものでは 1 分程度で陽性反応がみられ、遅くとも 10 分で最終判定が可能である。操作手技全般での簡便性は、これまでのキットに比べて非常に優れており、外来診療の側での検査も可能なキットといえる。QV は

ノイラミニダーゼ阻害剤の投与適応を決定する際には特に有用である。迅速検査を医師自身が行わなければならないような医療環境であっても、検査の簡便性から臨床での使用は容易であり、適正な抗インフルエンザ薬の投与が可能になる。小児用のノイラミニダーゼ阻害剤も近く認可される見通しであり、将来的には小児におけるインフルエンザ迅速診断キットとしても有用性が高まるものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 山崎雅彦, 三田村敬子, 木村和弘, 菅谷憲夫, 他. イムノクロマトグラフィー法によるインフルエンザ迅速診断キットの臨床的検討. 感染症誌 2001;75(12):1047-53.

2. 川上千春, 清水英明, 渡辺寿美, 菅谷憲夫, 他. イムノクロマトグラフィー法による A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討. 感染症誌 2001;75(9):792-9.

3. Sugaya N, Yoshikawa T, Miura M, Ishizuka T, Kawakami C, Asano Y. Influenza Encephalopathy Associated with Infection with Human Herpesvirus 6 and/or Human Herpesvirus 7. Clin Infect Dis 2002;34(4):461-6.



## H9 亜型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体の作製

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

共同研究者：中川直子 神戸市環境保健研究所

研究要旨：新型インフルエンザとして登場する可能性がある H9 亜型インフルエンザウイルスをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した。22 種類の HA に対する抗体と、5 種類の NP に対する抗体が得られた。HA に対する抗体の中で、6 種類は HI 活性を有していた。これらの抗体は、新しく分離されたインフルエンザウイルスの迅速なタイピングと、H9 の抗原解析に有用と考えられた。

### A. 研究目的

前年度の研究で、共通中和エピトープを認識するモノクローナル抗体、C179 は H1、H2、H5、H9 の調べたすべてのウイルスと反応し、中和することを明かにした。これらの亜型のウイルスは新型インフルエンザとして出現する可能性の高いものであるが、それぞれの亜型をタイピングするためには、亜型特異的に反応するモノクローナル抗体が必要となる。そこで今回、H9 のインフルエンザウイルスをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製し、それらの生物活性を調べた。

### 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。

A/New Caledonia/20/99(H1N1)

A/Panama/2007/99(H3N2)

A/Duck/HongKong/702/99(H9N5)

（北大獣医、喜田 宏博士より分与された）

モノクローナル抗体：定法に従い、マウスに A/Duck/HongKong/702/99(H9N5) を免疫し、ウイルスに特異的に反応するハイブリドーマをクローニングした。これらのハイブリドーマ細胞をマウス腹腔内に接種し、腹水を採取した。

染色試験：陽性抗体のスクリーニングは、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、ハイブリドーマ上清を 80  $\mu$ /well ずつ添加し、37°C で 30 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 倍階段希釈した抗体（マウス腹水）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て培養した 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<sub>2</sub> 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 (ペーリンガー) 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 PVDF 膜にプロットし、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。

(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

A/Duck/HongKong/702/99(H9N5) を感染させた MDCK 細胞に対する染色活性を指標としてハイブリドーマのスクリーニングを行ない、27 種類のモノクローナル抗体を得た。免疫沈降反応によって抗体が認識するウイルス蛋白を同定したところ、22 種類が HA に対する、また 5 種類が NP に対する抗体であることを証明した。

22 種類の HA に対する抗体について A/Duck/HongKong/702/99(H9N5) を抗原として HI 試験で調べたところ、6 種類が HI 活性を有し、その中で 5 種類の抗体が中和価も陽性であった。これらの抗体の AH1 と AH3 のウイルスに対する交差反応性を染色試験で調べたところ、2 種類の抗体を除いてすべて反応陰性であった。例外の抗体 (6E3、10G10) は AH1 とともに反応し、交差反応性を有するユニークな抗体であった。

5 種類の NP に対する抗体の中で、3 種類は染色試験で AH1 と AH3 のウイルスとも反応した。当然ではあるが、5 種類とも HI 活性、中和活性とも陰性であった。

### D. 考察

今後、新型インフルエンザとして出現する可能性の高いのは H5、H6、H9 と考えられている。特に H9 は 1999 年に香港で入院患者から分離され、さらに中国南部の一部の住民が抗体を保持していることから注意が必要な亜型である。

我々は、以前より亜型特異的なモノクローナル抗体を作製し、疫学調査や迅速診断に応用して成果を上げてきた。その中で、C179 は H1、H3、B の 3 種類が流行している現在において、H1 亜型を特異的に検出する抗体として有用なことを証明してきた。しかし、この抗体は H1 以外にも H2、H5、H9 にも反応し、新型ウイルスを型別するためには、それぞれの亜型だけに特異的に反応するモノクローナル抗体の作製が必要となった。そこで今回、H9 に対するモノクローナル抗体の作製し、新型ウイルスの診断に役立てようと考えた。

HA に対する抗体は 22 種類得られたが、HI 活性を有するのは 6 種類、中和活性を有するものは 5 種類と少なかった。これらの抗体は H1、H3 とは反応せず、亜型特異的な抗体と推測された。H1、H3 以外の亜型と多数の H9 株に対する反応性を調べ、新型ウイルスの型別に有用か否かを検討する必要がある。HA に対する抗体でもあるにもかかわらず、6E3、10G10 は H1 と反応した。H1 と H9 に共通に存在するエピトープと認識する抗体と考えられる。今後、これらの抗体を新型ウイルスの診断だけでなく H9 の抗原解析に活用したいと考えている。

### E. 結論

H9 亜型のトリインフルエンザウイルスに対する 27 種類のモノクローナル抗体が得られた。このうち、22 種類は HA に対する抗体で、5 種類は中和活性を有していた。これらの抗体は、新型ウイルスの診断だけでなく抗原解析に有用と思われる。

### F. 研究発表

#### (1) 論文発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., and Okuno, Y. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J. Gen. Virol.* 82:2169-2172. 2001.
2. Nakagawa, N., Kubota, R., Morikawa, S., Nakagawa, T., Baba, K., and Okuno, Y. Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 65:745-750. 2001.
3. 奥野良信: 高齢者のインフルエンザ予防策

(一週一話). 日本医事新報, 4040:85, 2001

4. 奥野良信: インフルエンザの疫学と変異. 小児感染免疫, 13(4): 355-358, 2001
5. 奥野良信: インフルエンザウイルス (分担執筆). 感染症研究のいま (大阪大学新世紀セミナー) (本田武司、生田和良、堀井俊宏編), p.51 - 57, 大阪大学出版会, 2001

(2) 学会発表

1. 弓指孝博、木村朝昭、奥野良信: 高齢者におけるインフルエンザワクチン接種後の HI および中和抗体の経時的推移について. 第 42 回日本臨床ウイルス学会、名古屋 (2001、6)
2. 岡本成史、川端重忠、中川一路、奥野良信、浜田茂幸: インフルエンザウイルス及び A 群レンサ球菌により引き起こされる劇症型感染症の発症とそのメカニズム. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
3. 廣野ゆかり、鈴木和宏、赤堀 泰、黒澤良和、久保田律子、鈴木定彦、奥野良信: インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクロナル抗体の作製. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
4. 齋藤紀幸、安岐昌子、一口 毅、天辻康夫、馬場宏一、森川佐依子、加瀬哲男、奥野良信: インフルエンザ A/B 検出迅速診断キットの開発. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
5. 加瀬哲男、森川佐依子、奥野良信、馬場宏一: 2000/2001 年シーズンを通しての 1 小児科におけるインフルエンザの観察. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
6. 中川直子、奴久妻聡一、呉 笑山、中川俊正、奥野良信、林皓三郎: B 型インフルエンザウイルス Yamagata タイプの抗原性変異の解析. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
7. 奥野良信: インフルエンザの疫学とウイルス変異. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
8. 池田 優、森口直彦、磯川貞之、吉岡加寿夫、片岡 知、加瀬哲男、奥野良信: インフルエンザワクチン接種にもかかわらずインフルエンザ脳症をきたした一例. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
9. 因田祥子、森島恒雄、富樫武弘、水口 雅、

横田俊平、田代真人、岡部信彦、奥野良信、宮崎千明: インフルエンザ脳炎・脳症全国調査-検査所見を中心に- (インフルエンザ脳炎・脳症研究班. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11))

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
奥野良信	インフルエンザウイルス	本田武司 生田和良 堀井俊宏	感染症研究のいま	大阪大学出版会	大阪	2001	51-57

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Reickert,T., Sugaya,N., Fedson,D., Glezen,W., Simonen,L., <u>Tashiro,M</u>	The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza.	New Engl. J. Med.	344	889-896	2001
Kato,A., Ohnishi,Y., Hohase,M., Saito,S., <u>Tashiro,M.</u> , Nagai,Y	Y2 the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the antiviral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis	J. Virol.	76	3802-3810	2001
Saito,T., Lim,W., Suzuki,Y., Kida,H., Nishimura,S.-I., <u>Tashiro,M.</u>	Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong.	Vaccine	20	125-133	2001
Layne, S.P., Beigelsdijk,T. J., Taubenberger, J. K., Cox, N. J., Gust, I.D., Hay, A.J., <u>Tashiro,M.</u> , Lavanchy,D	Global laboratory against influenza	Science	293	1729	2001
Saito T, Lim W, Suzuki T, Suzuki Y, <u>Kida H</u> , Nishimura SI, Tashiro M.	Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong.	Vaccine	20	125-133	2001
Ozaki H, Sugiura T, Sugita S, Imagawa H, <u>Kida H.</u>	Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses.	Vet Microbiol	82	111-119	2001
Watanabe T, Watanabe S, Ito H, <u>Kida H</u> , Kawaoka Y.	Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity.	J Virol	75	5656-5662	2001
Lim YK, Takada A, Tanizaki T, Ozaki H, Okazaki K, <u>Kida H.</u>	Mucosal vaccination against influenza: protection of pigs immunized with inactivated virus and ether-split vaccine.	Jpn J Vet Res	48	197-203	2001
Ozaki H, Shimizu-Nei A, Sugita S, Sugiura T, Imagawa H, <u>Kida H.</u>	Antigenic variation among equine H3N8 influenza virus hemagglutinins	Jpn J Vet Res	48	177-186	2001
Hatta M, Gao P, Halfmann P, <u>Kawaoka Y</u>	Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses	Science	298	1840-1842	2001
Watanabe T, Watanabe S, Ito H, <u>Kida H</u> , <u>Kawaoka Y</u>	Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity	J. Virol.	75	5656-5662	2001
Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, <u>Kawaoka Y</u> , Hinshaw VS	Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells	J. Virol.	75	7875-7881	2001
Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kuwayama M, <u>Kawaoka Y</u> , Otsuki K	Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens	J. Virol.	75	4439-4443	2001
Mase M, Imada T, Sanada Y, Etoh M, Sanada N,	Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to	J. Virol.	75	3490-3494	2001