

2002年9月、モンゴル北部で採取した461検体の水禽糞便から101株のインフルエンザウイルス(2 H1N1、2 H3N3、20 H3N6、48 H3N8、12 H4N6、1 H4N7、1 H4N8、1 H7N1、9 H7N7、5 H8N4)を分離した。モンゴル中央部で採取した489検体からは8株(1 H1N1、5 H3N8、2 H4N6)を分離した。一方、同時期に内モンゴルで採取した233検体の水禽糞便からはウイルスは分離されなかった。

同年9～11月に北海道大学構内および稚内市大沼で採取した324検体から8株のインフルエンザウイルス(3 H3N8、1 H5N3、1 H11N9、1 H12N5)を分離した。

2) 中国本土のニワトリで流行しているH9N2インフルエンザウイルスの系統解析

1995～1999年に中国各地のニワトリから分離されたH9N2ウイルスのHA遺伝子を解析した。その結果、すべてユーラシア系統中のA/chicken/Hong Kong/G9/97を含むG9亜群に属した。レセプター特異性に関与する234位のアミノ酸は、カモ由来ウイルスではすべてGluであったのに対し、中国のニワトリ分離株では様々な変異が認められた。さらにその一部はヒト由来株と同様Leuに置換していた。

中国のニワトリ分離株のN2亜型NAは何れも63～65番アミノ酸を欠失していた。遺伝子はG9亜群に属するウイルスのそれと近縁であったが、異なるクラスターを形成した。PB2ならびにPB1遺伝子は既報のウイルス株と異なる亜群に分類された。その他の内部蛋白遺伝子はG9亜群に属した。

D. 考察

モンゴル北部で採取した水禽糞便から様々な抗

原亜型のインフルエンザウイルスを多数分離した。陽性率は約22%であった。一方、同時期すでに内モンゴルまで南下していたカモの糞便からはウイルスは分離されなかった。この成績は、水禽のインフルエンザウイルスは営巣湖沼中に冬期間凍結保存されるとする仮説を支持するものである。

中国本土のニワトリに流行しているH9N2ウイルスの全遺伝子分節を解析した。HAのレセプター結合に関与するアミノ酸はニワトリ分離株では様々な変異が認められたのに対し、カモ由来株では一定であった。一部にはヒト由来ウイルス株と同様な配列を示す株が存在した。この多様性はカモのウイルスがニワトリに馴化する過程を反映していると考えられる。中国本土のニワトリ分離株のNA、PA、NP、MおよびNS遺伝子はG9亜群に属するウイルスのそれらと近縁であった。また、PB2およびPB1遺伝子は既報のウイルス株と異なる亜群に分類された。したがって、中国本土のニワトリに流行しているH9N2インフルエンザウイルスは1997年に香港で分離された強毒H5N1ウイルスへの遺伝子供与体と考えられているA/quail/Hong Kong/G1/97を含むG1亜群のH9N2ウイルスとは異なることが判明した。

E. 結論

シベリア、モンゴルおよび北海道で採取したカモの糞便から様々な亜型のインフルエンザウイルスを分離した。1994年以降中国のニワトリの間で流行しているH9N2ウイルスは、1997年に香港で分離された強毒H5N1ウイルスへの遺伝子供与体と考えられているH9N2ウイルスとは異なる亜群に属した。

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

ヒトとトリのインフルエンザウイルスの宿主域を決定する遺伝子の同定

分担研究者 河岡義裕 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 インフルエンザウイルスの自然宿主は野生の水禽である。水禽の間で保持されているウイルスがその他の動物種に伝搬すると考えられているが、通常個々のウイルスの宿主域は限られている。そこで、ヒトとトリのインフルエンザウイルスの宿主域を決定する遺伝子を同定するために、ヒト由来 A/Memphis/8/88 (H3N2) およびトリ由来 A/Mallard/New York/6750/78 (H2N2) のリバー・ジェネティクス法を確立し、様々な組み合わせで遺伝子再集合体を作成し、アヒルの腸管での増殖性を比較した。その結果、ヒトとトリのインフルエンザウイルスの間では、遺伝子の非互換性(incompatibility)が認められる事、ならびに M および NS 遺伝子以外の全ての遺伝子が宿主域を左右する因子として関与している事が判明した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはヒトのみならず様々な哺乳類および鳥類から分離される。自然宿主はカモ等の野生水禽であり、水禽のウイルスがその他の動物種に伝播すると考えられている。しかし、通常それぞれのウイルスの宿主域は限られている。例えば、トリのウイルスは直接にはヒトに感染しない。また、現在ヒトに流行しているインフルエンザウイルスはトリ由来のウイルスであると考えられているが、これらのウイルスを実験的にアヒルに感染させても、トリインフルエンザウイルスの主要な感染臓器である腸管でさえウイルスは全く増殖できない。ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼがこの宿主域の制限に関わっている事が知られているが、その他の遺伝子に関しては全く明らかになっていない。

そこで、リバー・ジェネティクス法を用いてヒトとトリのウイルスの間で様々な遺伝子再集合体を作成する事を試みた。また、培養細胞で増殖可能なウイルスに関しては、アヒルの腸管における増殖性を調べた。

B. 研究方法

ヒト由来 A/Memphis/8/88 (Mem/88) (H3N2) およびカモ由来 A/Mallard/New York/6750/78 (Mal/NY) (H2N2) をリバー・ジェネティクス法を用いて作出した。次に、Mal/NY の遺伝子を 1 種類ずつ Mem/88 の遺伝子と置換した遺伝子再集合体、HA および NA 遺伝子の両方を置換した再集合体およびポリメラーゼと NP をすべて置換した再集合体を作成し、これらのウイルスの培養細胞およびアヒルの腸管での増殖性を比較した。さらに、培養細胞での増殖が認められたものに関して、MDCK および CEF 細胞を用いて、37 度および 41 度での増殖性を比較した。

C. 研究結果および考察

1. Mem/88 と Mal/NY の遺伝子再集合体の作出：まず、様々な組み合わせの遺伝子再集合体を Mem/88 と Mal/NY との間で作成する事を試みた。その結果、Mal/NY の PB2、NP、M または NS 遺伝子を Mem/88 の遺伝子と置換したウイルスは作出することが出来た。しかし、Mal/NY の PB1、PA、HA または NA 遺伝子を Mem/88 の遺伝子

と置換したウイルスは作出できなかった。一方、HA と NA 両方、3 種類のポリメラーゼを全てまたは 3 種類のポリメラーゼと NP 遺伝子を置換したウイルスは作出できた。これらの成績は、Mem/88 と Mal/NY 間の遺伝子再集合体の培養細胞における増殖性には、HA および NA に加えて、3 種類のポリメラーゼと NP 遺伝子の互換性(compatibility)が重要であることを示している。

2. Mem/88 と Mal/NY の遺伝子再集合体の培養細胞における 37 度および 41 度での増殖性：一般にトリ由来のウイルスは、41℃(トリの体温)でも良く増殖するが、ヒトのウイルスは温度感受性である。これは温度感受性である事がヒトのウイルスがトリの体内で増殖できない理由である可能性を示唆する。そこで、MDCK および CEF 細胞を用いて、作出した遺伝子再集合体の増殖性を 37℃および 41℃で比較した。その結果、Mal/NY の PB2、NP、または HA と NA の両方の遺伝子を Mem/88 の遺伝子と置換したウイルスは 41 度では増殖しなかったが、M、NS または 3 種類のポリメラーゼと NP 遺伝子を置換したウイルスは増殖可能であった。これらの成績は Mem/88 の温度感受性には HA および NA が関与している事、ならびに、3 種類のポリメラーゼと NP 遺伝子の高温における機能的非互換性も関与している事を示している。

3. Mem/88 と Mal/NY の遺伝子再集合体のアヒルの腸管における増殖性：ヒトおよびトリインフルエンザウイルスの宿主域の制限に関わる遺伝子を同定するために、作出した遺伝子再集合体のアヒルでの増殖性を調べた。培養細胞で増殖可能なウイルスをアヒルに経口あるいは経直腸接種し、腸管でのウイルス増殖能を比較した結果、Mal/NY の M または NS 遺伝子を Mem/88 の遺伝子と置換したウイルスは Mal/NY 同様にアヒルの腸管で増殖したが、その他のウイルスは増殖できない事が判った。この成績は、M および NS 以外の全ての遺伝子がヒトとトリのインフルエンザウイルスの宿主域を左右す

る因子として重要である事を示している。また、Mal/NY の 3 種類のポリメラーゼと NP 遺伝子を Mem/88 の遺伝子と置換したウイルスは培養細胞において 41 度で増殖可能であったが、アヒルの腸管で増殖できなかった事から、これらの蛋白質が高温で機能を発揮できる事とアヒル体内で増殖できる事は直接関わりがないと考えられた。

D. 結論

- ・ヒトとトリのインフルエンザウイルスの間では、遺伝子の非互換性(Incompatibility)が認められる。
- ・M および NS 以外の全ての遺伝子がヒトとトリのインフルエンザウイルスの宿主域を左右する因子として重要である。

E. 研究発表

1. Hatta M, Halfmann P, Wells K, Kawaoka Y (2002) Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine. *Virology* 10; 295: 250-255.

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

M2 イオンチャンネル活性を欠くインフルエンザウイルスの弱毒生ワクチン
としての可能性

分担研究者 河岡義裕 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 A型インフルエンザウイルスのM2蛋白質にはイオンチャンネル活性がある。我々はこれまでに、M2のイオンチャンネル活性を欠失させると、マウスに対する病原性が低下することを明らかにした。そこで、このM2イオンチャンネル活性を欠失したウイルスを、弱毒生ワクチンとして用い、その感染防御効果をマウスモデルで検討した。

A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンは、ウイルスを不活化して皮下に接種する事により血中抗体の応答を誘導し、重症化を防ぐ。しかし、局所免疫および細胞性免疫を殆ど誘導しないので、完全な感染防御には至らない。

低温馴化株を用いた生ワクチンが新しいアプローチとして注目されているが、現行の不活化ワクチンと比較して、感染防御効果はそれほど高くはなく改善の余地がある。

我々はこれまでに、A型インフルエンザウイルスのM2蛋白質が持つイオンチャンネル活性を欠失させると、培養細胞における増殖性には影響はないが、マウスに対する病原性が低下することを明らかにした。そこで、本研究では、このM2イオンチャンネル活性を欠失させた変異ウイルスを弱毒生ワクチンとして用いて、強毒ウイルスに対する感染防御効果を調べた。

B. 研究方法

A/WSN/33 (H1N1) のM遺伝子をA/Udorn/72 (H3N2)のものに換えたウイルスをリバーシ・ジェネティクス法を用いて作出した(WSN-UdM)。また、A/Udorn/72のM蛋白質遺伝子に変異を導入しM2イオンチャンネル活性を欠失させたウイルスを同様に作出した(M2del29-31)。

4週齢のBALB/cマウスの鼻腔内に 2×10^3 PFUのM2del29-31を滴下接種して、

2週間後に血清、鼻腔洗浄液および肺洗浄液を採取して、ウイルス特異抗体をELISAで測定した。ワクチンを接種して2週間後、1ヶ月後および3ヶ月後に致死量($100LD_{50}$)のA/WSN/33を経鼻的に感染させて攻撃し、生残率ならびに肺のウイルス感染価を測定した。

C. 研究結果および考察

1. M2del29-31の弱毒化：これまでに、M2del29-31のマウスの肺における増殖性はWSN-UdMの10分の1程度であること、ならびにM2del29-31の鼻腔介における増殖が殆ど認められない事を明らかにした。そこで、さらにM2del29-31の弱毒化の程度を調べるためにマウスにおける LD_{50} を決定した。その結果、M2del29-31は $10^{5.8}$ PFU、WSN-UdMは $10^{6.3}$ PFUであった。

2. M2del29-31で免疫したマウスの抗体応答：M2del29-31を鼻腔内に接種して2週間後に、ウイルス特異的抗体をELISAで測定した。免疫したマウスの鼻腔洗浄液および肺洗浄液中にIgGおよびIgA抗体の両方が検出された。また、血清中にはIgG抗体が検出された。これらの成績から、M2del29-31はマウスの呼吸器で増殖し、全身および粘膜局所の免疫応答を誘導した事が明らかになった。

3. M2del29-31 の生ワクチンとしての感染防御効果：ワクチンを接種して2週間後、1ヶ月後および3ヶ月後に致死量のA/WSN/33 を経鼻感染させた。いずれの場合も、コントロールのマウスでは著明な体重減少が観察され、全てが1週間以内に死亡したが、M2del29-31 をワクチンとして接種したマウスは体重減少を示すことなく全てが生残した。また、ウイルス攻撃3日後に肺のウイルス量を測定した結果、コントロールのウイルスでは 10^7 PFU/g 以上のウイルスが検出されたが、免疫したマウスでは検出感度以下だった。これらの成績は M2del29-31 が弱毒生ワクチンとして有効である事を示している。

D. 結論

- ・マウスモデルにおいて、M2 イオンチャンネル活性を欠失させた変異インフルエンザウイルスは弱毒生ワクチンとして有効であった。
- ・M2 イオンチャンネル活性を欠失させる変異はウイルスを弱毒化させるが免疫原性は維持されるので、将来の生ワクチンウイルス株に導入出来る変異の1つであるかもしれない。

E. 研究発表

1. Watanabe T, Watanabe S, Kida H, Kawaoka Y. Influenza A virus with defective M2 ion channel activity as a live vaccine. *Virology* 299:266-270, 2002.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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 本郷誠治 山形大学医学部教授

研究要旨 アジア型インフルエンザウイルス（A/H2N2）のヘムアグルチニン（HA）は、1957年から1968年の流行期間中、球状部には終始169位に1本の糖鎖をもつだけで、糖鎖の増加はいつさい起こっていない。169位の糖鎖は、球状部に存在する唯一の糖鎖であることから、抗体圧からの回避に重要な役割を果たしていると考えられる。この糖鎖付加部位では、糖鎖付加モチーフ（NXS/T）が重複していた（169-NNTS-172）。重複部位では連続する2つのアミノ酸変異が起こらない限り糖鎖の欠失は免れる。この事実は重複部位における糖鎖付加の重要性を示唆する。同様の重複モチーフは20位の糖鎖付加部位にも見られた（20-NNST-23）。本研究では、HAの20、21位と169、170位に存在する重複糖鎖付加部位のうち的一方あるいは両方を人為的に欠失させるとH2分子の性状はどのように変化するかという点について解明を試みた。その結果、糖鎖付加の有無ではなく、糖鎖付加部位を構成するアミノ酸配列がH2分子の生物活性に重要であることが明らかになった。

A. 研究目的

A/H2N2 ウイルスの HA は 11 年間の流行期間中、球状部には終始 169 位に 1 本の糖鎖をもつだけで、糖鎖の増加はいつさい起こっていない。一方、現在も流行を起し続けている A/H3N2 ウイルスの HA は、1968 年の出現当時には球状部に 2 本の糖鎖をもつにすぎなかったが、次第にその数を増やしており、1997 年には 6 本の糖鎖をもつに至っている。また、A/H1N1 ウイルスや B 型ウイルスの HA も球状部に 4~5 本の糖鎖をもっており、糖鎖の数を増やすことによって効率よく抗体圧から逃れている可能性が強い。先に我々は H2 分子も 131 位、160 位及び 187 位のいずれかに 1 本の糖鎖を獲得する潜在能力をもつことを明らかにした。しかし、球状部の糖鎖の数を人為的に増加させると H2 分子の生物活性が著しく低下することから、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た。A/H2N2 ウイルスの HA における 169 位の糖鎖は、球状部に存在する唯一の糖鎖であることから、抗体圧からの回避に重要な役割を果たしていると考えられる。この糖鎖付加部位では、糖鎖付加モチーフ（NXS/T）が重複していた（169-NNTS-172）。重複部位では、たとえ一方の N にアミノ酸変異が起こっても、他方の N に糖鎖が付加されるために、糖鎖の欠失は免れる。この事実は重複部位における糖鎖付加が重要である可能性を疑わせる。同様の重複モチーフは 20 位の糖鎖付加部位にも見られた（20-NNST-23）。本研究では、HA の 20、21 位と 169、170 位に存在する重複糖鎖付加部位のうち的一方あるいは両方を人為的に欠失させると H2 分子の性状はどのように変化するかという点について解

明を試みた。

B. 研究方法

20, 21 位及び 169, 170 位の重複糖鎖付加部位を欠失する HA 蛋白の発現：親株の HA cDNA の糖鎖付加部位の N または S/T を A に置換する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。

1. 免疫沈降法：発現 COS 細胞を ^{35}S -メチオニンでラベルし、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降により回収した HA を、SDS-PAGE により解析した。

2. 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%) 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、OD₅₄₀ を測定することによって定量した。

3. 細胞融合試験：発現 COS 細胞を TPCK-trypsin (5 $\mu\text{g/ml}$) で処理し、pH 5.0 の培養液に 5 分間さらした後、通常の培養液中で培養した。3 時間後、細胞をメタノールで固定し、ギムザ液で染色した後、多核細胞形成を観察した。

C. 研究結果

重複糖鎖付加部位を欠失させた変異 HA 蛋白の性状：20, 21 位及び 169, 170 位の重複糖鎖付加部位の一方あるいは両方を欠失させた合計 12 個の変異 HA 蛋白を COS 細胞で発現させ、その性状を野生型 (WT) HA と比較した。

1) 20, 21 位及び 169, 170 位の重複糖鎖付加部位において、重複部位のいずれかが糖鎖の付加を受けることが明らかになった。

2) 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、 ^{35}S -メチオニンで 20 分パルスラベルした発現細胞を 4 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。また回収した HA を TPCK-

trypsin (5 $\mu\text{g/ml}$) で処理し、細胞表面に出現した HA の開裂の程度を調べた。その結果、S/T を A に置換することにより 20, 21 位及び 169, 170 位の糖鎖を完全に欠くようになった変異蛋白 (20-NNAA, 169-NNAA) は、細胞内輸送能に影響を受けなかった。しかし N を A に置換することにより 20, 21 位及び 169, 170 位の糖鎖を完全に欠くようになった変異蛋白 (20-AAST, 169-AATS) では細胞内輸送能が著しく阻害された。したがって、H2 分子の細胞内輸送能は 20, 21 位及び 169, 170 位への糖鎖の付加ではなく、糖鎖付加部位を構成するアミノ酸配列により影響を受けると結論される。

3) レセプター結合能：各変異蛋白を発現させた COS 細胞にモルモット赤血球を用いて赤血球吸着試験を行った結果、各蛋白発現細胞の赤血球吸着能は H2 分子の細胞表面への輸送の程度に一致していた。

4) 膜融合能：各変異蛋白を発現させた COS 細胞に細胞融合試験を行った結果、各蛋白発現細胞の膜融合能は H2 分子の細胞表面への輸送の程度にほぼ一致していた。以上の成績から、H2 分子のレセプター結合能及び膜融合能も 20, 21 位及び 169, 170 位への糖鎖付加の有無ではなく、糖鎖付加部位を構成するアミノ酸により影響を受けると結論される。

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 4~6 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。これは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ものと考えられる。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、球状部への糖鎖の付加はレセプター結合能及び膜融合能に影響を及ぼし、新たに 3 本の糖鎖を付加

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ている。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ため、糖鎖を増やせず、そのため抗体圧に対してアミノ酸置換だけで対応せざるをえないと考えられる。しかし、今回の結果から、H2 分子のレセプター結合能及び膜融合能は糖鎖付加部位を構成するアミノ酸配列により影響を受けることが明らかになった。このため H2 分子は H1 や H3 に比べ機能的拘束が強いことが推測される。したがって A/H2N2 ウイルスは、免疫からの回避のために HA の球状部に新たな糖鎖を獲得するか、あるいはアミノ酸を置換するという戦略を十分利用できなかった可能性が疑われる。これが 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。

E. 結論

A/H2N2 ウイルスの HA にみられる 2 つの重複糖鎖付加部位の役割を調べた結果、H2 分子の細胞内輸送能および生物活性には糖鎖の付加ではなく、糖鎖付加部位を構成するアミノ酸が重要であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya, E., Sugawara, K., Hongo, S., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., Li, Z-N., and Nakamura, K. (2002). Role of overlapping glycosylation sequons in antigenic properties, intracellular transport and biological activities of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin. *J Gen Virol.* 83, 3067-3074.

2. 高下恵美, 本郷誠治. (2002). なぜ H2N2 ウイルスは短命だったか. *インフルエンザ* 3, 265-270.

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

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3部第1室室長

研究要旨 新型インフルエンザ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することは、これによって起こるパンデミックで被る被害を最小限にとどめるための重要な対策である。これには、通常のインフルエンザシーズンにおける株サーベイランスの強化と、H5N1 など新型ウイルスが出現した際に、原因ウイルスを迅速に入手できる協力体制の確立、さらに新型ウイルスと抗原性が類似した株をワクチン製造株として速やかに供給できるウイルス株の系統保存バンクの拡充などが必要である。我々は昨年度に引き続き、これらインターパンデミックでの準備を行った。さらに、2003年2月に香港で再び発生した H5N1 の感染事例においては、ヒトからの H5N1 分離株を速やかに入手して、遺伝子操作法により弱毒ワクチンの開発を行った。

共同研究者

西藤岳彦、板村繁之、斉藤利憲、今井正樹、二宮愛（国立感染症研究所ウイルス第3部第1室）

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）

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

わが国では 1997 年の H5N1 感染事件を期に、新型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、拡充していかね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 年以来香港のトリ市場では、H5N1 トリインフルエンザのたび重なる小流行が起り、分離されるウイルスの遺伝子組成も分離される株ごとに多様であることから、頻繁に遺伝子再集合を起こした新しい H5N1 ウイルスが次々に出現している。しかし、香港では 1997 年の経験と対応策がその後の流行対策に生かされ、2003 年 2 月に再びヒトへの感染者が報告されるまでは新たな H5N1 のヒトへの感染はくい止められてきた。

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 5%）、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 HI 試験にて亜型の同定を行った。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 トリインフルエンザワクチン力価測定試薬の作製。

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、ワクチン力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/pa/Narita/92A/98 (H9N2)、A/duck/Fukuoka/3/2000 (H2N3)、A/duck/Hokkaido/33/96 (H6N7)である。大量培養したウイルスを濃縮精製し、HA 蛋白を単離してウサギに免疫して抗血清を作製した。また、精製ウイルスの一部をエーテル処理後、ホルマリンを添加して不活化ワクチンを試作した。

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、感染研インフルエンザウイルス室、情報センターおよび全国の地衛研との連携により、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・遺伝子解析が行われた。

これらのシステムを駆使して行われた平成14年度(2001/02 シーズン)の株サーベイランス

の結果、A/ソ連型(H1)、A/香港型(H3)、B型は2:2:1の比率の混合流行であったことが明らかになった。これらの抗原解析、HA 遺伝子解析の結果、A/ソ連型(H1)、A/香港型(H3)の流行の主流は、ワクチン株と類似していることが分かった。一方、B型ウイルスの流行はワクチン株とは別系統である Victoria 系統に属する B/香港/330/2001 類似株が主流であった。これらの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14年度は、A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Panama /2007/99 (H3N2)、B/山東/7/97 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、韓国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、2001/02 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てい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。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

行および 2003 年の H5N1 ウイルスのヒトへの感染時の対応。

2002 年には香港のトリ市場で強毒型の H5N1 ウイルスの小流行が 2 回発生したが、そのつどトリ市場の閉鎖と鶏の殺処分が行われ、ヒトへの感染は回避された。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、ヒトへの感染が確認された時の対応に備えた。

一方、2003 年 2 月になって、香港および福建省で H5N1 ウイルスにヒトが感染し、現時点で感染者 3 名、死者 2 名が出ている。我々は WHO からこの報告を受け直ちに原因ウイルス株の入手を行った。これには前年度の課題であった厚生労働省結核感染症課および農水省畜産局衛生課の連携がうまく機能し、発生から 1 週間あまりで株を入手することに成功した。

ウイルス株が入手できるまでのあいだに、弱毒化ウイルスワクチンの作製段取り、手順が検討された。今回は、病原性の一つを規定している HA 蛋白開裂部位の改変および弱毒ウイルスの作製には、cDNA を用いた reverse genetics 法を採用し、WHO の H5N1 ワクチン作製の方針どおり background gene にはヒトや動物に対して安全性が確認されており、また高増殖株作製のマスター株として使用されている PR8 株 cDNA を採用することにした。

現在、弱毒型 H5N1 組み換えウイルスワクチンの開発が行われている。

4. 動物インフルエンザウイルスの系統保存とトリウイルスを用いた試作ワクチンの作製。
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系統保存バンクの中から選択し、速やかにワクチン製造に取りかかれる体制が整っていることが必要である。我々

は、これまで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 の亜型の同定を完了している。また、地衛研で分離された 4 株の H5N1 ウイルスも性状解析後にバンクに補填された。これらの中から、今年度は新型インフルエンザ対策上、H5 ウイルスに次いで重要な亜型である H2、H6、H9 ウイルスについて、大量培養・精製を行いエーテル処理後、ホルマリン添加により試作 HA ワクチンを作製した。また、精製ウイルスの一部を用いてワクチン力価測定用の試薬を作製した。

D. 考察

昨年に引き続き、通常の流行株のサーベイランス体制の強化とネットワーク化の整備更新を行ったことから、情報収集網は完全に構築されたと思われる。また、海外からのウイルス株の迅速な入手については、厚労省と農水省の連携が課題であったが、2003 年 2 月の H5N1 感染事例の際には、両省庁間のすばやい対応により、原因ウイルス株の短期間での入手が可能であった。これによってウイルス株入手の手続き上の遅延問題は解決できたと考えられる。

一方、今回ヒトから分離された H5N1 株はこれまで分離された H5 ウイルスとは抗原性が大きく異なり、ウイルス株系統保存バンクでは対応できないことが分かった。しかし、これらの株に対する抗血清は新型ウイルスにも十分に交叉反応することから、ウイルス検出用キット血清として対応できる。従って、今後はウイルス株の収集よりも、同一亜型ウイルスの中でも抗原性の異なる株に対する抗血清の作製に重点を移し、より多くのウイルス株を検出できるウイルス検出キットの作製に重点をおいた方向へと軌道修正することが必要である。

強毒型の H5N1 ウイルスから HA 遺伝子を改変した弱毒型 H5N1 ワクチンの開発においては、PR8 株 cDNA を background としたりバースジ

エネティクス法で弱毒 H5N1 ウイルスを作製する方針が進められた。この方法をワクチン開発に採用するに当たり、今後早急に解決しなければならない問題点が浮上してきた。すなわち、ウイルス作製に用いる cDNA ベクターの特許使用料の問題、GMP 基準を満たした遺伝子導入用の培養細胞 (Vero 細胞) の確保および特許使用料の問題、組み換え遺伝子ワクチンの承認までの手続き短縮化の問題、培養細胞を用いたワクチン製造および認可の問題など、パンデミックが起こるまでの間に早急に議論し、製剤として使用できるための段取りと手続きを完了しておく必要がある。

E. 研究発表

1 論文発表

1 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 小田切孝人 インフルエンザウイルスの世界の動向と今冬の日本の予測。The Medical Test Journal, 836, 5 (2002)。

3 小田切孝人 新型インフルエンザウイルス対策サーベイランス状況も踏まえて。化学療法の領域 18, 1735-1740 (2002)。

4 小田切孝人 感染症サーベイランスからわかること。臨床と研究、79、2140-2144 (2002)。

2 学会発表

1 小田切孝人。感染研と地衛研の協力体制：インフルエンザへの対応。第 12 回感染研シンポジウム、新宿区戸山、5 月、2002。

2 小田切孝人、岡部信彦、田代真人、斉藤玲子、鈴木宏、柏木征三郎。わが国のインフルエンザ株サーベイランスとワクチン株選定。第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田、6 月、2002

3 小田切孝人、渡辺真治、今井正樹、斉藤利憲、

板村繁之、西藤岳彦、多屋慧子、新井智、岡部信彦、田代真人。わが国のインフルエンザ株サーベイランスと新型インフルエンザ対策。第 23 回衛生微生物技術協議会研究会。奈良市、7 月、2002

4 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、渡辺真治、今井正樹、二宮愛、田代真人。2001/2002 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌、10 月 (2002)。

5 川上千春、宗村徹也、七種美和子、野口有三、西藤岳彦、小田切孝人、田代真人、中島節子。横浜市で分離された AH1N2 型ウイルスの性状。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌、10 月 (2002)。

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 BM2 蛋白質の細胞内輸送機序の解析。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌、10 月 (2002)。

7 Sinji Watanabe, Masaki Imai and Takato Odagiri. The influenza B virus BM2 is transported in cytoplasm by the trans Golgi network and is integrated into plasma membrane. The First European Influenza Conference, Malta October 20-23, 2002.

8 Takato Odagiri Detecting human emergence. 7th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Shanghai, October 31-November 1, 2002.

F. 知的所有権の取得状況

なし

小児への抗インフルエンザウイルス剤の投与と耐性化

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。我々は過去 2 年間に引き続き、2001/02 年シーズン中、新潟県内小児科外来のインフルエンザ患者で 1) 2001/02 年シーズン中、市中株でのアマンタジン耐性株頻度は、0.0% (0 / 137)であった。Am(-)と(+)の TCID₅₀ 力価差の時系列的検討で、2001/02 年の Am(+)の希釈列でのウイルス力価上昇は軽微であり、Am の処方量の減少に起因すると考えられた。2) B 型インフルエンザにオセルタミビルを投与した際の熱型について検討したところ約 1 日解熱がはやまった。3) 1999/2000 年、2000/2001 年シーズン中アマンタジンを小児に投与した際の耐性株のサブタイプによる臨床的特徴を再度解析したところ、耐性化した群では A/H3N2 型で H1N1 型に比し熱の再上昇が顕著にみられた。

A. 研究目的

これまで我々は A 型インフルエンザ患者にアマンタジンを投与した際、容易に耐性化が生じることを報告してきた。H14 年度はこれまでに引き続き、新潟県内小児科外来のインフルエンザ患者で 1)市中株でのアマンタジン耐性株の動向、2) B 型インフルエンザにオセルタミビルを投与した際の熱型について検討した。また、3) 1999/2000 年、2000/2001 年シーズン中アマンタジンを小児に投与した際の耐性株のサブタイプによる臨床的特徴について再度解析を試みた。

より A 型および B 型インフルエンザ感染が確認された患児を対象とした。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、咽頭ぬぐい液を採取し A 型インフルエンザ株からは Am 耐性株の検索を行った。

2) B 型インフルエンザで同意の得られた体重 32.5kg 以上の群にオセルタミビル 5 日間、75-150mg/日を投与し、保護者に熱型記載を依頼した。

B. 研究方法

i) 対象

1) 2001/02 年シーズン中、新潟市の小児科医院を発症 48 時間以内に受診した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(Quick Seiken AD[®] , デンカ生研)に

ii) 実験室的方法

咽頭ぬぐい液から MDCK 細胞を用いてインフルエンザウイルス分離を行い、同時に咽頭ぬぐい液から PCR により A 及び B 型インフルエンザウイルスの検出を行った。Am 耐性株の判定はこれまで報告した PCR-RFLP、

TCID₅₀ 法を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ケンスを行いアミノ酸変異を確認した。

3) 1999/2000, 2000/2001 年シーズンでアマンタジン投与を 5mg/kg/日・3日間(最大一日量 100mg) 受けた A 型インフルエンザ患児で耐性化の有無とサブタイプで熱型を再検討した。

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 TCID₅₀ 法でアマンタジン入り(+)と無し(-)の希釈列での A 型インフルエンザ力価を比較した。前 2 シーズンではインフルエンザ流行に伴い 2, 3 週ほど遅れて Am(+)希釈列でのウイルス力価の上昇が見られ、Am 耐性株の易出現性を示唆していた。

2001/02 年シーズンは前シーズンに比して上昇は軽度であったがやはり流行と共に Am(+)力価が微増する傾向にあった。しかし、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(0/137 株)(図 1)。

2) 54 名の B 型インフルエンザ患児(平均年齢 10.2 才)に対しオセルタミビルを投与した。26 名のコントロール患児(平均年齢 6.2 才)に比して、オセルタミビル群では投与後 1 日目で 37℃以下に解熱したのに対し、コントロール群では投与後 2 日目に 37℃以下となり解熱に約 1 日の差が見られた(図 2)。

3) 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ことを前年度報告した。

同一症例群で熱型を分析したところ、Am 投与群では H1N1 に比して H3N2 群で熱の遷延傾向がみられたため、サブタイプ別に耐性化の有無で熱型を分析した。H1N1 では感受性群と耐性群

で熱型はほぼ同じであり、二峰性の発熱を認めなかった(図 3)。しかし、H3N2 群では、とくに耐性群で第 4 病日以降熱の再上昇が顕著で、第 5 病日には感受性群と耐性群では有意に耐性群で体温が高かった($p < 0.05$)(図 4)。

D. 考察

これまで我々は、A 型インフルエンザ患者で高齢者施設や小児に対する Am 投与の際の耐性化について報告してきた。Am 投与後約 1/3 に耐性がみられ、他の研究者の報告と一致している。

また、市中株での Am 耐性株を小児科の初診時株でモニターを継続しており、2001/02 年シーズンは初診時に耐性株は見つからなかった。当該シーズンでのインフルエンザ患者に対する Am 処方量は約 80 万人分と推測され、前年度と同程度で、流行に伴う Am(+)希釈列中でのウイルス力価の上昇も顕著でなかったことから、相対的 Am 処方量の減少が市中株での耐性の増加を防いでいると考えられた。

また、これまで耐性株出現頻度、アミノ酸変異部位にサブタイプで差が見られることを報告したが、同一の症例で熱型に関しても差が見られ、Am 投与群で熱の再上昇が H3N2 では H1N1 に比して顕著で、さらに詳細に検討すると H3N2 群では耐性化群で 2 峰性熱を取りやすくなることが判明し、サブタイプでの違いと共に、耐性化が臨床経過に対して影響を与えている可能性が示唆された。なお、倫理面の問題からブラインドコントロールをとれなかったため、コントロール群との差をみることができなかった。

また B 型インフルエンザに対するノイラミニダーゼ阻害剤の効果も確認できた。なお、B 型インフルエンザに関してはオセルタミビルでの耐性化が報告されていないため今回は検討しなかった。

本邦では Am に加え、ノイラミニダーゼ阻害剤が認可され、その処方量は激増している。2002/03 年は、シーズン当初 400 万人分が輸入されていたにもかかわらず、相対的な薬剤の不足を

引き起こし、社会的な問題となった。これまでノイラミニダーゼ阻害剤では Am に比して耐性化が少なく、感染性も弱いとされていたが、処方増加による耐性ウイルスの増加も危惧されている。また、ノイラミニダーゼ阻害剤の不足のため Am も多く処方されたと推測され、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

本邦での大量の使用にもかかわらず、耐性株の市中での増加傾向は小さかった。Am 投与後、耐性化した群では A/H3N2 型で H1N1 型に比し熱の再上昇が顕著にみられた。B 型インフルエンザに対してオセルタミビルは有効であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. R.Saito, T.Sakai, I.Sato, Y.Sano, H.Oshitani, M.Sato, H.Suzuki. Frequency of amantadine resistant influenza A viruses in two seasons featuring co-circulation of H1N1 and H3N2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003(in press)
2. 齋藤玲子、坂井貴胤、佐藤瑞穂、鈴木宏。ウイルス感染症の化学療法と耐性化。化学療法の領域 18(10): 45-50, 2002
3. 鈴木宏、齋藤玲子。インフルエンザ流行の前に準備すべきこと。フォローアップの注意点は何か。臨床と薬物治療 21(9):898-901, 2002
4. 鈴木宏、齋藤玲子、坂井貴胤、押谷仁、増田寛樹、佐藤博、西川眞。新潟県高齢者施設と一般病院におけるアマンタジン耐性インフルエンザウイルスの分子疫学。新潟医学会雑誌。116(6): 245-251, 2002
5. 鈴木宏、齋藤玲子、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(2):179-182, 2002
6. 齋藤玲子、西川眞、篠川旦、鈴木宏。かぜ症候群の疫学。今月の治療 11(1):85-89,2002

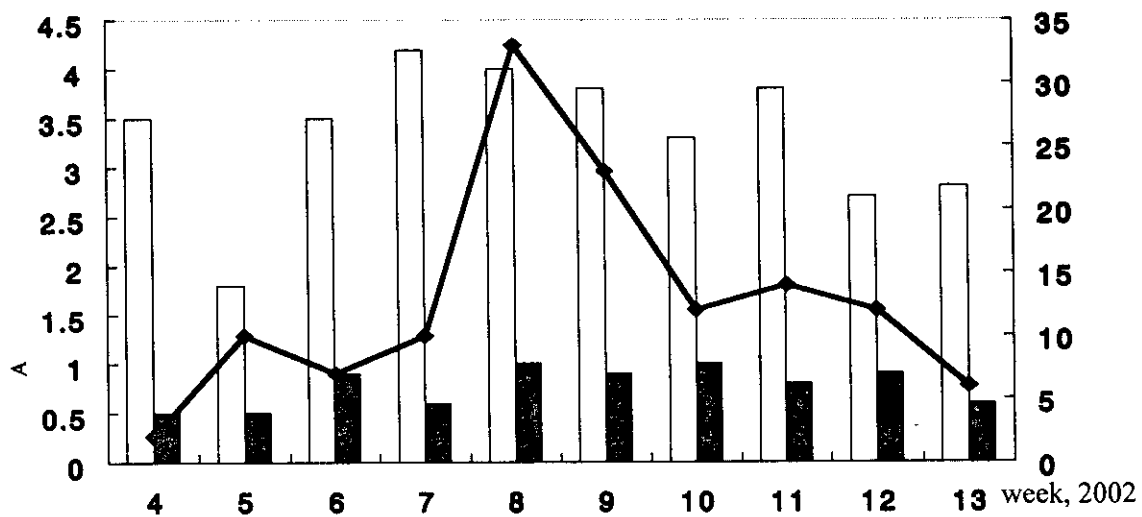


図1. 2001/02年シーズン、市中分離型インフルエンザ株中の週別 $TCID_{50}/0.2ml$ 力価
 □Am無しの希釈列中の平均ウイルス力価。■Am入り($200\mu g/ml$)希釈列中の平均ウイルス力価。実線は検体採取した医院でA型インフルエンザ患者数

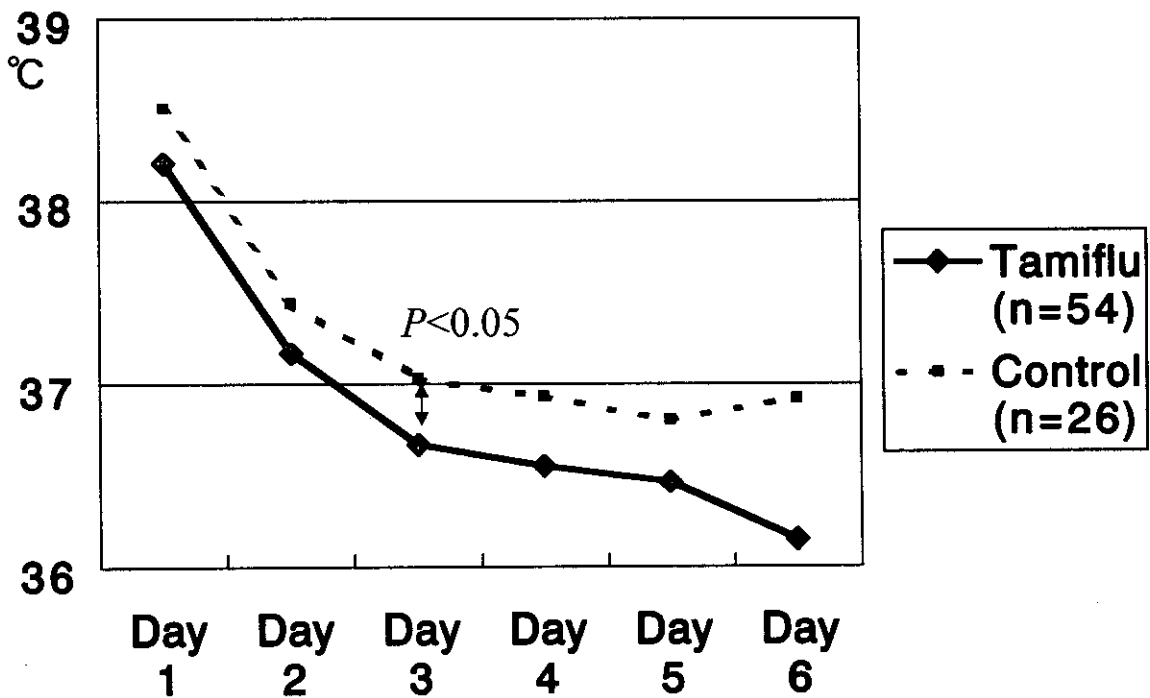


図2. B型インフルエンザ罹患小児へのタミフル投与時の熱
 体温は1日3回測定 of 平均値

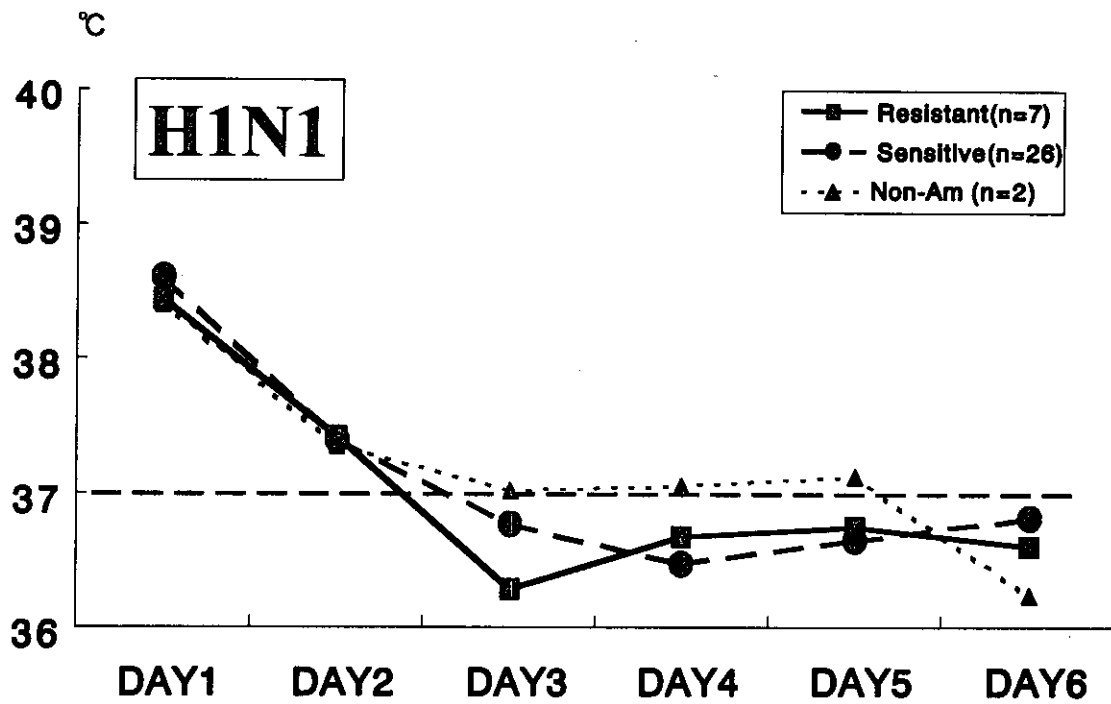


Figure 3. Reduction of fever in Am treated children with H1N1 infections, in the two seasons of 1999/2000 and 2001/01. Comparison among patients who shed resistant and sensitive viruses, and control group

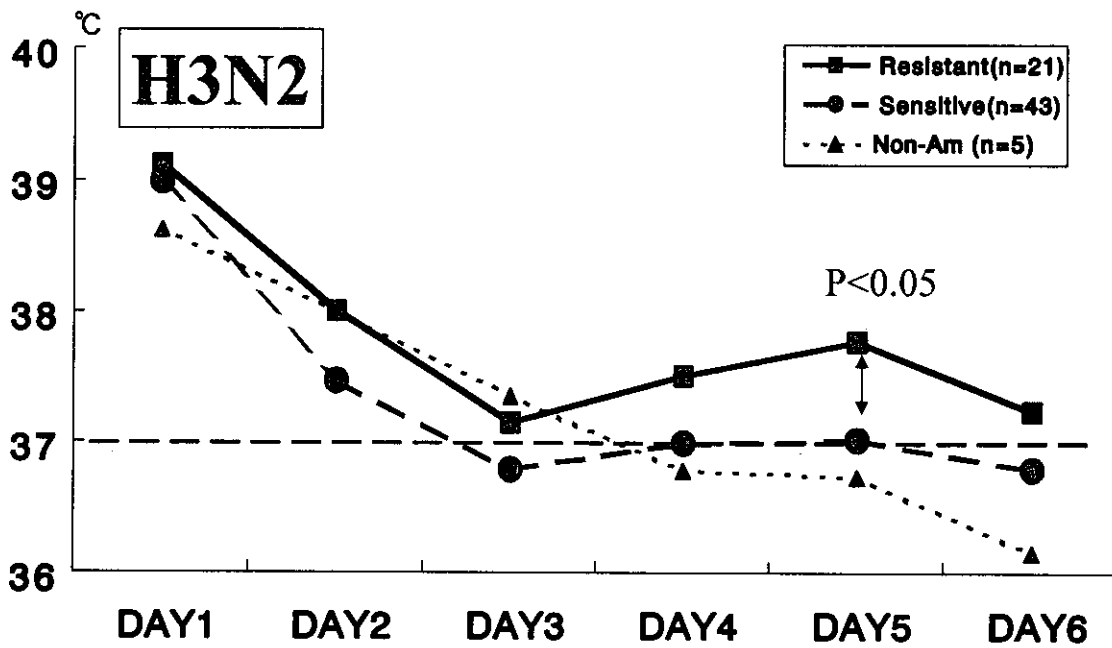


Figure 4. Reduction of fever in Am treated children with H3N2 infections, in the two seasons of 1999/2000 and 2001/01. Comparison among patients who shed resistant and sensitive viruses, and control group

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

研究要旨 我々は、遺伝子操作により作成したインフルエンザウイルス A/WSN 株由来 NS1 蛋白変異株を、培養細胞とマウスを用いた感染実験により解析し、いくつかの変異株は弱毒化されたり温度感受性致死変異を示す事、また弱毒ワクチン株として期待される免疫原性を示す事を報告した。遺伝子操作によるこれら変異の導入は弱毒ワクチン株開発の技術として利用可能であるが、その分子機構を知ることは弱毒ワクチン株の安全性を保証する上で重要である。そこで、同様の変異を導入した NS1 蛋白を大腸菌で発現し、プロテインキナーゼ A でリン酸化後、単離精製し、*in vitro* の翻訳系に添加してインフルエンザウイルス遺伝子発現における NS1 蛋白の機能と機能ドメインを検証した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルス NS1 蛋白は非構造蛋白であるが、感染細胞内ではリン酸化を受け多様な機能を持ち、宿主細胞の遺伝子発現や免疫機能を抑制したり、インフルエンザウイルスの翻訳調節に関わり、ウイルスの病原性に関与する事が知られている。遺伝子組み換えにより作成した NS1 蛋白の変異株には、弱毒化されるものや、温度感受性致死変異となるものがある。これらは弱毒ワクチン株としての応用が可能であるので、本研究では NS1 蛋白の機能に焦点を絞って、弱毒化の分子機構を解析した。NS1 蛋白変異ウイルスの感染細胞レベルの解析と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解析して報告を行った。今年度は *in vitro* で分子機構を明らかにするための解析結果について報告する。

B. 研究方法

WSN 株由来 NS1 蛋白 (230 残基) を野生型として、N 端 110 残基 (N110)、C 端 190 残基 (C190)、及び 66-77 残基目の欠損 (*dH12*) 蛋白を変異型として作成した。NS1 蛋白は 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に結合させた後、非結合蛋白を PBS で洗浄除去後、樹脂に結合した NS1 蛋白をプロテインキナーゼ A を用い

てリン酸化した。次に、リン酸化酵素を PBS で洗浄後 GST をスロンピンで切断除去しリン酸化した NS1 蛋白を単離した。ウサギ網状赤血球ライセートにインフルエンザウイルス WSN 株感染 MDBK 細胞からオリゴ dT セルロースを用いて精製した mRNA と ³⁵S-Met を添加し、*in vitro* の翻訳系として、NS1 蛋白の機能解析に用いた。発現蛋白は免疫沈降と SDS-PAGE 続くフルオログラフィーにより解析した。

（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

リン酸化されていない野生型 NS1 蛋白は *in vitro* の翻訳系でウイルス mRNA からの NP と M1 蛋白の翻訳を促進したが、NS1 蛋白の翻訳促進活性は弱かった。リン酸化した NS1 蛋白を用いると NP と M1 の翻訳促進活性は顕著に強くなり、リン酸化が重要であることが示された。一方、リン酸化した NS1 蛋白を過剰に添加すると、NP と M1 蛋白の翻訳促進活性は飽和するが、NS1 蛋白の翻訳促進活性は顕著に増加した。この結果は、NS1 蛋白とそれぞれの mRNA の翻訳開始部位上流に存在する 5'-UTR との結合親和性の違いを反映しているもの

と考えられた。この結果は、さらにすでに報告されている NS1 蛋白と mRNA 5'-UTR 結合アッセイの結果と一致する。

次に、NS1 蛋白変異株の解析を行った。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野生型よりは低いものの有意に確認された。これらの矛盾は、この変異蛋白は 138-147 残基目に存在する核外輸送シグナル (NES) を欠損しているため、感染細胞内では変異 NS1 蛋白が核内に蓄積するために、翻訳の場である細胞質に移行できないためであると考えられた。一方、C190-NS1 蛋白は翻訳促進活性が完全に欠損していた。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。dl12 温度感受性変異ウイルスは非許容温度で感染細胞内のすべての翻訳を阻害するが、この C190 蛋白の添加量を増加させても翻訳の阻害は確認されず、C190 が欠損する領域は宿主因子との結合領域も含むためと考えられた。一方、dl12 温度感受性変異ウイルスは非許容温度で感染細胞内のすべての翻訳を阻害するが、*in vitro* の翻訳系の反応温度 30℃では、許容温度なので野生型の NS1 蛋白と同様の活性を示した。

D. 考察

NS1 蛋白は多機能な蛋白であるが、機能の一つとして翻訳促進活性を持つ。当該研究により NS1 蛋白のリン酸化は、活性に必須ではないが重要である事が示された。NS1 蛋白上に予想されるプロテインキナーゼ A のリン酸化部位は 3 カ所存在するが *in vivo* でそれらの部位が実際にリン酸化されているか未だ確認していない。翻訳促進活性には NS1 蛋白の 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が、*in vivo* では核外輸送シグナルも必要である。*In vitro* の解析から 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たが、当該解析結果は NS1 蛋白の濃度依存性をきれいに示しており、*in vivo* の結果と一致した。NP の mRNA の 5'-UTR に存在するユニークな stem-loop 構造の機能、及びこれらに結合する細胞因子や翻訳開始因子の同定を試みているが未だ有意な結果は得られていない。当該研究では NS1 蛋白が、インフルエン

ザウイルスの遺伝子発現を調節すること、その欠損により弱毒化され、ワクチン株開発に応用可能であることを示した。一方、NS1 蛋白は宿主の遺伝子発現や免疫機構の抑制にも関わっており、dl12 変異蛋白はこれらの機能に欠損を持つために、*in vitro* の翻訳系では *in vivo* の系で見られた有意な翻訳阻害が見られなかったとも考えられる。NS1 蛋白変異株は翻訳以外にもこれら多様な機能に影響を与えていることが考えられる。

E. 結論

NS1 蛋白は多機能な蛋白で、遺伝子発現や免疫機構の抑制に関与しており、ウイルスの病原性とも関わっている。遺伝子操作による NS1 蛋白への部位特異的変異の導入はこれらの機能に欠損を与え、弱毒ワクチン株開発の有力な技術となる。少なくとも当該研究により 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遺伝子発現制御機能の欠損により説明された。

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) Enami, M. Reverse genetics. *Vaccine*, 21, S61, 2002.
- 3) 榎並正芳。インフルエンザウイルス-ウイルスの感染と複製機構の分子論的研究の展開-。ウイルス 52, 55-59, 2002.

2. 学会発表

- 1) M. Enami, C. T. Guo, H. Ueda, and T. Hirose. Analysis of translational regulation by influenza virus NS1 protein *in vitro*. XIIth International Congress of Virology, Symposium, July 2002, Paris.
- 2) 郭 潮潭、広瀬敏治、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解析。第 50 回日本ウイルス学会学術集会、2002 年 10 月、札幌

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担報告書

小児の A 型および B 型インフルエンザに対する oseltamivir の効果

分担研究者 菅谷憲夫 けいゆう病院小児科部長

研究要旨 2002 年初頭のインフルエンザ流行時に、インフルエンザ迅速診断が陽性の小児インフルエンザ患者に、oseltamivir を投与してその有効性を熱型から検討した。oseltamivir は、1 回量 2mg/kg で 1 日 2 回、5 日間投与した。発症してから 2 日以内に来院した小児のインフルエンザ患者 131 例（平均年齢 5.8±3.6 歳、範囲 0.8-14 歳）に、oseltamivir を投与すると、翌日には 44% の患者が 37.5 度以下に下熱し、2 日後には 86% の患者が下熱することが明らかになった。投与開始から下熱までの日数は、平均で 1.7 日であった。oseltamivir の下熱効果には、A 型と B 型インフルエンザ患者の間で有意差はなく、A 型のみならず、B 型インフルエンザにも同程度に有効であった。oseltamivir の有効性について、3 歳以下の幼児と学童で比較したが、下熱効果には両群で差はみられず、低年齢層でも高い効果があることが明らかとなった。oseltamivir の投与により、一部で嘔吐や下痢を認めたが投薬を中断した例はなかった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（neuraminidase）は、インフルエンザの表面にある糖蛋白で、1) 感染細胞からのウイルスの遊離、2) 細胞から遊離したウイルスの凝集の防止等の作用があり、インフルエンザウイルスが、細胞から出て周囲に広がる時に必要である。ウイルス表面にあるノイラミニダーゼの活性部位のアミノ酸の配列は、A 型、B 型インフルエンザに共通で、通常は、この部分にシアル酸が結合しノイラミニダーゼが活性化するが、シアル酸 analogue であるノイラミニダーゼ阻害剤（neuraminidase inhibitor）は活性部位に入り込み、シアル酸との結合を妨害し、ノイラミニダーゼ活性化を阻害する。したがって、

気道の細胞内部で増殖したインフルエンザウイルスは、細胞の周辺で不活化されて周囲の細胞への感染拡大が阻害される。

ノイラミニダーゼ阻害剤の利点は、アマンタジンと比べて、1) A 型、B 型、両方のインフルエンザに有効で、2) 耐性ウイルスの出現頻度が低く、生じた耐性ウイルスは感染性が弱く、3) 重篤な副作用はないという 3 点である。現在は 2 種類のノイラミニダーゼ阻害剤が使用されている。内服薬の oseltamivir（商品名タミフル）は、日本でも 2001 年の 2 月から成人を対象に承認され、2002 年の 1 月には、1 歳以上の小児を対象にドライシロップ剤も承認された。もう一つは、吸入で使用する zanamivir（商品名リレンザ）で、治療薬として日本では 15