

Iwatsuki-Horimoto, Taisuke Horimoto, Hiroshi Kida, and Yoshihiro Kawaoka. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. Journal of Veterinary Medical Science, in press.

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

小児急性中耳炎の難治化のメカニズムと感染予防・制御に関する研究

分担研究者：山中 昇 和歌山県立医科大学教授

## 研究要旨

小児急性中耳炎、遷延性中耳炎の起炎菌における薬剤耐性化および薬剤耐性遺伝子を検討した。肺炎球菌において、ペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp1a, pbp2x, pbp2b)の変異およびマクロライド耐性遺伝子(emAM, mefE)の発現を、インフルエンザ菌における薬剤耐性化についてはβ-ラクタマーゼ産生およびペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp3)の変異についてPCR法により検討した。

### 1) ペニシリン耐性肺炎球菌およびマクロライド耐性肺炎球菌

小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から採取した肺炎球菌866株についてペニシリン結合蛋白遺伝子を検討し、245株(28.3%)は遺伝子変異を認めなかったが、333株(38.5%)でpbp1a, pbp2b, pbp2xの3遺伝子、78株(9%)に2遺伝子変異、245株(28.3%)において1遺伝子変異が認められた。また、セフェム系抗菌薬に対する低感受性を示すpbp2x変異株が全体の94.5%検出された。一方、マクロライド耐性肺炎球菌のmefEおよびermB遺伝子の発現を検討し、30%が両方の耐性遺伝子を発現せず、32.5%がmefE、34%がermB、3.4%(28株)に両方の遺伝子発現が認められた。

### 2) インフルエンザ菌における遺伝子変異

小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から検出されたインフルエンザ菌について薬剤感受性に関する遺伝子を検討し、bla遺伝子は4.7%に、ftsI遺伝子(gBLNAR)は23.3%に発現していた。

以上の結果から小児急性中耳炎の起炎菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌において高率に薬剤耐性化が進行していることが判明した。

## A. 研究目的

急性中耳炎は小児における気道感染症においてもっとも頻度の高い疾患の一つであるが、近年、急性中耳炎の臨床像が大きく変貌し日常臨床において大きな問題となっている。すなわち、経口抗菌薬の治療にも関わらず改善しない遷延例や感染を繰り返す反復例が増加しており、特に3才未満の乳幼児に難治例が集中している。このような変貌する急性中耳炎に対しては、感染症が病原微生物とそれに対する生体の防御能すなわち免疫とのバランスの上に成り立つものと考え、宿主と病原微生物の相互作用を分子レベルで検討するとともに、宿主を取り巻く環境や病原微生物を取り巻く微小環境、さらに集団における伝

播様式などを含めた総合的な研究が必要である。本研究は、細菌の薬剤耐性化や増殖速度、ビルレンス、バイオフィーム産生能、さらにその伝播様式などの分子生物学的検討と宿主側の細菌特異的免疫能の検討を行い、難治性感染症の病態を解明するとともに、その感染予防としての粘膜ワクチンの開発を目的とする。

## B. 研究方法

小児急性中耳炎、遷延性中耳炎の起炎菌における薬剤耐性化および薬剤耐性遺伝子について検討を行った。

肺炎球菌において、ペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp1a, pbp2x, pbp2b)における遺伝子の変異および

マクロライド耐性遺伝子(emAM、mefE)の発現を PCR 法により検討し、また、インフルエンザ菌における薬剤耐性化についてはβ-ラクタマーゼ産生およびペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp3)の変異について PCR 法により検討した。さらに、これらの薬剤耐性遺伝子の検索と従来から用いられている微量液体希釈法および Disk 法による薬剤感受性検査との比較検討を行った

### C. 研究結果

#### 1) ペニシリン耐性肺炎球菌およびマクロライド耐性肺炎球菌

小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から採取した肺炎球菌866株についてペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp)の変異を検討した結果、245株(28.3%)において遺伝子変異は認められなかったが、333株(38.5%)でpbp1a, pbp2b, pbp2xの3遺伝子の変異が認められ、78株(9%)に2遺伝子変異が、245株(28.3%)において1遺伝子変異が認められた。さらに注目すべき成績は全体の94.5%に当たる656株において、セフェム系抗菌薬に対する低感受性を示すpbp2x変異株が検出されたことである。

一方、マクロライド耐性肺炎球菌に関しては、mefE およびermB遺伝子の発現を検討したところ、30%がいずれの耐性遺伝子も発現していなかったが、32.5%がmefEを、34%がermBを発現しており、さらに3.4%(28株)において両方の遺伝子発現が認められた。

#### 2) インフルエンザ菌における遺伝子変異

小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から検出されたインフルエンザ菌について薬剤感受性に関係する遺伝子の検討を行ったところ、bla遺伝子の発現は4.7%に、ftsI遺伝子(gBLNAR)は23.3%に発現していた。

以上の結果から小児急性中耳炎の起炎菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌において高率に薬剤耐性化が進行していることが判明した。

### D. 論文発表

1. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N. High Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with

Mutations in pbp1a, pbp2x, and pbp2b Genes of Penicillin-Binding Proteins in the Nasopharynx in Children in Japan. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006 Feb 3;68(3):139-145

2. Billal DS, Hotomi M, Tasnim S, Fujihara K, Yamanaka N. Evaluation of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Otitis Media Patients by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006 Jan 30;68(3):135-138
3. Hotomi M, Sakai KF, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamanaka N. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx among Japanese children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2006 Feb;126(2):130-7.
4. Sakai A, Hotomi M, Billal DS, Yamauchi K, Shimada J, Tamura S, Fujihara K, Yamanaka N. Evaluation of mutations in penicillin binding protein-3 gene of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2005 Feb;125(2):180-3.
5. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N. Increase of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*-expressing mefE or ermB gene in the nasopharynx among children with otitis media. *Laryngoscope.* 2005 Feb;115(2):317-20.

### E. 学会発表

- 1) N. Yamanaka. Genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* isolated from the upper respiratory tract in Japan and influence of treatment policy. Acute Respiratory Panel, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. January 24-25, 2006. Galveston, USA.

F. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
（分担）研究報告書  
パラミクソウイルス持続感染成立の多様性に関する研究

（分担）研究者 伊藤 康彦 三重大学医学部教授

**研究趣旨：**パラミクソウイルスは自然宿主において持続感染することが多い。多数のルブラウイルス持続感染細胞系を用いて、その成立過程を解析した。持続感染成立過程は多様性を示し、少なくとも5つに分類することができた。センダイウイルスによる持続感染成立に貢献していないと思われていたF蛋白もM蛋白と共にpositiveに関与していることが明らかになった。意外なことにHN蛋白はNegativeな役割を果たしていることも明らかになった。

**A. 研究目的**

パラミクソウイルスは自然宿主において持続感染することが多い。私たちはセンダイウイルスを用い、その持続感染成立の初期過程を解析し、持続感染成立の分子機構を明らかにしてきた。しかしながら、持続感染成立の初期過程の解析はセンダイウイルスの場合を除いて殆どされていない。センダイウイルスで得られた結果が普遍性を有するかどうかを確認する為にルブラウイルス持続感染細胞系を用いて、その成立過程を解析した。

**B. 研究方法**

細胞としてはHeLa細胞とVero細胞を用いた。ウイルスとしてはMumpsウイルス、センダイウイルス名古屋株、hPIV2（東芝株とCA株）、SV41、SV5（WR株とT1株）及びhPIV4A&4Bを用いた。ウイルス持続感染細胞の樹立は、HeLa細胞にmoi 100~0.1でウイルスを感染させ、そのまま継代培養する方法と限界希釈法を用いてクローニングする方法を用いた。ウイルス持続感染細胞のスクリーニングには赤血球吸着法を使用した。樹立された持続感染細胞をさらに継代培養し、その性状を解析した。また、持続感染樹立能を定量する方法を工夫した。

**C. 結果**

- 1) Mumpsウイルス、hPIV2（東芝株とCA株）、SV5（WR株とT1株）、及びhPIV4A&4B持続感染細胞を樹立した。
- 2) 持続感染成立過程は多様性を示し、少なくとも5つに分類することができた。
- 3) 持続感染（Steady state）樹立効率を定量化する方法を確立した。
- 4) ウイルスの持続感染樹立効率にはウイルス間で大きなばらつきがあった。
- 5) hPIV2（CA株）、SV5（T1株）及びhPIV4A&4B感染細胞は速やかに Steady stateの持続感染細胞が成立する。
- 6) hPIV2（東芝株）およびSV5（WR株）感染細胞をそのまま継代培養すると、比較的速やかに持続感染細胞が成立するが、成立した持続感染細胞はSteady stateとCarrier stateのmixtureであった。
- 7) センダイウイルスによる持続感染成立に貢献していないと思われていたF蛋白もM蛋白と共にpositiveに関与していることが明らかになった。意外なことにHN蛋白はNegativeな役割を果たしていることも明らかになった。
- 8) インターフェロンの持続感染樹立効率にたいする効果を定量的に解析したところ、インターフェロンの樹立効率増強作用が確認された。

#### D. 考察

以上のように、ウイルス持続感染成立過程は一様で、多様性があることが明らかになった。今後その分子基盤について解析をする予定である。また、持続感染が破綻を示す機構についても、手がかりがえられたので、持続感染の維持及び破綻の分子機構についても解析してゆく必要がある。

#### E. 結論

呼吸器感染ウイルスであるパラミクソウイルスは細胞に感染した場合、容易に持続感染が成立することが明らかになるとともに、その持続感染成立の過程は多様性に富んでいることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) M. Nishimura, K. Yuasa, K. Mori, N. Miyamoto, M. Ito, M. Tsurudome, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada, A. Uchida, Y. Ito  
Cytological properties of stromal cells derived from giant cell tumor of bone (GCTSC) which can induce osteoclast formation of human blood monocytes without cell to cell contact. *J Ortho. Res.* 23:979-987,(2005)

(2) M. Nishio<sup>1</sup>, M. Tsurudome, M. Ito, D. Garcin, D. Kolakofsky, and Y. Ito  
Identification of Paramyxovirus V protein residues essential for STAT protein degradation and promotion of virus replication. *J. Virology* 79,8591-8601,(2005)

(3) M. Nishio, M. Tsurudome, M. Ito, and Y. Ito  
Human Parainfluenza Virus Type 4 Incapable of Evading the Interferon-Induced Antiviral Effect  
*J. Virology* 79, 14756-14768 (2005)

(4) M. Nishio, M. Tsurudome, M. Ito, and Y. Ito

Identification of RNA-Binding Regions on the P and V Proteins of Human Parainfluenza Virus Type 2  
*Medical Microbiology and Immunology* (in press)

(5) M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada, and Y. Ito  
A mutant fusion (F) protein of simian virus 5 induces hemagglutinin-neuraminidase-independent syncytium formation despite the internalization of the F protein  
*Virology* (in press)

(6) H. Komada, A. Imai, E. Hattori, M. Ito, H. Tsumura, M. Kawano, M. Nishio, T. Onoda, M. Kuramochi, M. Tani, K. Yamamoto, M. Yamane, Y. Kozuka, Y. Yamashita, K. Yuasa, J. Morita, M. O'Brien, M. Okumura, J. Uemastu, M. Tsurudome and Y. Ito  
Regulation of lymphocyte activation through CD98 is independent of IL-2/IL-2R system.  
*Biomedical Research* (in press)

(7) M. Nishio, A. Nagata, A. Yamamoto, M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, H. Komada and Y. Ito.  
The Properties of Recombinant Sendai Virus having the P gene of Sendai Virus pi Strain Derived from BHK Cells Persistently Infected with Sendai Virus  
*Medical Microbiology and Immunology* (in press)

##### 2. 学会発表

(1) 伊藤康彦、山川 湖、西尾真智子、鶴留雅人、伊藤守弘、河野光雄、駒田 洋  
ウイルス持続感染細胞成立の多様性  
第53回日本ウイルス学会

(2) 西尾真智子、伊藤守弘、鶴留雅人、河野光雄、伊藤康彦  
パラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2) V蛋白と結合するウイルス及び細胞の蛋白  
第53回日本ウイルス学会

(3) マウスインターロイキン3 (mIL-4) を挿入したパラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)の性状解析

河野光雄、保富康宏、唐松克夫、松原明  
弘、高村史記、駒田 洋、伊藤守弘、鶴  
留雅人、西尾真智子、伊藤康彦  
第53会日本ウイルス学会

(4) パラミクソウイルス持続感染細胞間  
におけるウイルス干渉現象の違い  
山川 湖、伊藤守弘、西尾真智子、鶴留  
雅人、河野光雄、駒田 洋、伊藤康彦  
第53会日本ウイルス学会

(5) パラインフルエンザウイルスの遺伝  
子解析： 4型ウイルスを中心にして  
駒田 洋、河野光雄、伊藤守弘、西尾真

智子、山川 湖、鶴留雅人、伊藤康彦  
第53会日本ウイルス学会

(6) シミアンウイルス5 (SV5) 感染細  
胞内におけるF蛋白の構造変化の解析  
鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、河野  
光雄、駒田 洋、伊藤康彦  
第53会日本ウイルス学会

(7) SV5 T1株の低細胞傷害性（細胞融  
合）の分子機構  
伊藤守弘、西尾真智子、水谷伸也、駒田  
洋、河野光雄、伊藤康彦、鶴留雅人、  
第53会日本ウイルス学会

インフルエンザ菌の菌株特異的な肺感染防御能に関する研究

分担研究者 大石和徳、大阪大学感染症国際研究センター

研究協力者 小山 純、長崎大学熱帯医学研究所

### 研究要旨

我々はマウスモデルを用いてインフルエンザ菌の Non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) による菌特異的な肺感染防御獲得機構について検討し、以下の結果が得られて。

- 1) 同一の NTHi 株の気管内反復接種により菌株特異的な肺感染防御能が認められた。
- 2) NTHi の菌株によっては、その反復気管内接種により異なる NTHi 菌株に対する交叉肺感染防御能を誘導する場合がある。
- 3) 異なる NTHi 株の単回気管内接種ではいずれの NTHi 株に対する肺感染防御能は得られない。

### A. 研究目的

インフルエンザ菌は肺炎球菌にならんで重要な呼吸器病原性菌であり、とりわけ成人では慢性閉塞性肺疾患（COPD）の急性増悪の主要な原因菌である。COPD 患者ではしばしばインフルエンザ菌（Non-typable *Haemophilus influenzae*:NTHi）の反復感染が認められるが、NTHi 感染による感染防御抗体の獲得機構に関する検討は少ない。これまでに、COPD 患者において NTHi の新しい獲得により急性増悪が発症することが報告されている。また、NTHi には菌共通の外膜蛋白(OMP)として P4, P6、株間で異なる OMP として P2,P5 が存在する。とりわけ、P2 はその構成の 50%を占める主要な OMP である。そこで、我々はマウスモデルを用いて NTHi による菌特異的な肺感染防御獲得機構について検討することを目的とした。

### B. 研究方法

COPD 患者から分離された P2 分子の異なる NTHi 3 株を準備した。P2 分子の違いは SDS-PAGE と PCR による P2 分子のアミノ酸配列によって確認した。これらの 3 株 (A, B, C 株) を Balb/c マウス

に 1 週間間隔で 3 回経気管接種し、P6 に対する肺内リンパ節細胞の増殖反応、全菌体を抗原とした肺・全身の菌特異的抗体応答、NTHi 生菌 (A, B, C 株) を用いたマウス肺クリアランスアッセイにより肺感染防御能について検討した。

### C. 研究方法

1) P6 特異的免疫応答 : A 株 3 回接種 (A/A/A、B 株 3 回接種 B/B/B)、C 株 3 回接種 (C/C/C)、A・B・C 株接種 (A/B/C) のいずれにおいても肺所属リンパ節の P6 特異的細胞増殖が認められた。これを反映して、血漿中 P6 特異的 IgG, IgM がいずれの接種パターンによっても検出された。しかしながら、BALF 中 P6 特異的 IgA はどの接種パターンでもほとんど検出されなかった。

2) 菌特異的抗体産生 : 菌特異的抗体産生については A 菌表面抗原に対しては A/A/A, C/C/C, A/B/C 接種で血漿中に IgG 抗体、肺胞洗浄液 (BALF) 中に特異 IgA 抗体が検出された。同様に C 菌表面抗原に対しては A/A/A, C/C/C, A/B/C 接種で血漿中に IgG 抗体、肺胞洗浄液 (BALF) 中に特異 IgA 抗体が検出された。一方、B 菌表面抗原



に対しては B/B/B 接種のみならず A/A/A, C/C/C, A/B/C 接種でも血漿中に IgG 抗体、肺胞洗浄液 (BALF)中に特異 IgA 抗体が検出された。

3) マウス肺内 NTHi クリアランスについては A 菌と C 菌の気管内接種により A/A/A 接種および C/C/C 接種で NTHi 生菌のクリアランスが促進された。B 菌の気管内接種に対しては B/B/B 接種のみが有意な菌クリアランス促進を示し、前述の B 菌表面抗原特異的抗体の成績と一致しない結果であった。A/B/C 接種では、A, B, C 菌のいずれも有意な肺内菌クリアランス促進は認められなかった。

#### D. 考察

菌株の違いにかかわらず、3回の気管内接種により NTHi 共通抗原である P6 に対する肺所属リンパ節の細胞増殖反応は認められた。しかしながら、P6 特異的 IgA 産生はほとんど検出されなかった。結果として、同一の NTHi 株の反復接種により同一菌に特異的な血漿中 IgG, IgA が誘導され、同一菌による肺内クリアランスが促進された。A/A/A, C/C/C 接種によつては A 菌、B 菌、C 菌いずれの表面抗原に対する IgA 抗体が検出されたものの、肺内菌クリアランス促進は A 菌と C 菌でのみ認められた。一方、B/B/B 接種の場合には A 菌および C 菌表面抗原に対するものが検出されなかった。この特異 IgA 産生の欠如は、A 菌および C 菌に対しては肺内菌クリアランスが促進されなかったことを支持している。また、A/B/C 接種でも A 菌、B 菌、C 菌いずれの表面抗原に対する IgA 抗体が検出されたが、いずれの菌に対しても肺内クリアランスは促進されなかった。

#### E. 結論

- 1) 同一の NTHi 株の気管内反復接種により菌株特異的な肺感染防御能が認められた。
- 2) NTHi の菌株によつては、その反復気管内接種により異なる NTHi 菌株に対する交叉肺感染防御能を誘導する場合がある。

- 3) 異なる NTHi 株の単回気管内接種ではいずれの NTHi 株に対する肺感染防御能は得られない。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T. Usefulness of the Japanese Respiratory Society guidelines for community pneumonia : a retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a general hospital. *Respirology*. 10:208-214, 2005.
2. Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLH, Anh NTH, Huong VT, Phuong HVM, Thi PT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K. A comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 43:2474-2476, 2005.
3. Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Guio H, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Oishi K, and Nagatake T. Molecular analysis of intrafamilial transmission in *Moraxella catarrhalis*. *Int J Med Microbiol*, 295: 187-191, 2005.
4. Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*. 2006 (in press).

5. Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Oishi K. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F strains in Japan. *Epidemiol. Infect.* 2006 (in press)

6. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチン- 5年後の再接種の是非-. *呼吸器科*. 8(1) 68-72, 2005.

7. 大石和徳. 細菌性肺炎 (肺炎球菌性肺炎を中心に). *日本内科学会雑誌*. 94(11): 2256-2260, 2005.

8. 大石和徳. 肺炎球菌性肺炎とその対策. *臨床と研究*. 82(12):1983-1986, 2005.

## 2. 学会発表

1. 大石和徳: 肺炎球菌ワクチン: 成人、小児領域における今後の展望. 第37回日本小児感染症学会教育セミナー, 三重, 2005年11月11日.

2. Oishi K, Koyama J, Watanabe H. Role of strain-specific surface antigen in pulmonary defense against *Haemophilus influenzae* in a murine model. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Acute Respiratory Infections (ARI) Panel: January-24-26, 2006, Galveston, USA

## Ⅲ. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

H5N1 鳥インフルエンザプロトタイプワクチンの開発とその評価に関する研究

分担研究者 小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長

研究要旨 2004年にベトナムのヒトから分離された鳥由来のH5 ウイルスをリバーシジェネティクス(RG)法で弱毒化し、それを用いた不活化全粒子プロトタイプワクチンを開発した。H5 亜型鳥インフルエンザウイルスはヒトに対して極めて免疫原性が弱いことから、アルミニウムアジュバントを添加したアジュバントワクチンとし、この免疫原性、感染防御効果をマウスにおいて評価した。また、対照として2003年にヒトから分離されたH5N1株を用いたアジュバントワクチンと比較した。その結果、今回のプロトタイプワクチンは免疫原性が低く、2003年版のワクチンより少なくとも10倍以上のワクチン抗原量が必要であることが示された。

研究協力

二宮 愛 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 研究員

A. 研究目的

2003年末から東アジア諸国の家禽で発生したH5N1高病原性鳥インフルエンザ(H5N1-HPAI)の流行は、2年が経過した現在では東南アジア地域のみならず中国、ロシア、モンゴル、トルコ、ルーマニアなどユーラシア大陸全域に広がりつつあり、もはや制圧は不可能となっている。その間に、1億6千万羽を超える家禽が感染または殺処分によって失われ膨大な経済被害を出している。それと並行してベトナム、タイ、カンボジア、インドネシア、中国、トルコではヒトにも感染

し、現時点で160人の感染例と85名の死亡が確認され、今後も増え続けることが予想される。このことから、H5N1-HPAIに由来する新型インフルエンザによる世界的大流行(パンデミック)が危惧されている。

パンデミックが起こると未曾有の健康被害と社会混乱は避けられないが、これらを最小限にとどめるためには、H5N1プロトタイプワクチンの開発と実用化および国家備蓄など事前の準備が必要である。本研究では、2004年にベトナム人患者から分離されたH5N1ウイルスを用いて弱毒化ワクチンを開発し、その効果をマウスで評価した。これらの成果はH5N1プロトタイプワクチンの人での臨床試験および承認申請へ向けた補助的な情報として活用されている。

## B. 研究方法

### 不活化全粒子ワクチン

以下の弱毒化 H5N1 ウイルスを精製し、ホルマリンで不活化してワクチンを作製した。

- ワクチン株：2004 年にベトナムでヒトから分離された強毒株 A/VT/1194/2004 (H5N1) をリバースジェネティクス法で弱毒化した rg-A/VT/1194/2004 株
- ワクチン：上記ワクチン株と 2% アルム (Alm) アジュバント添加 (+) および非添加 (-) の 2 種類をワクチンとして作製した。

### マウスによるワクチン効果の検討

BALB/c (メス、4 週齢) を各群 5 匹ずつ使用した。0.02 ug、0.2ug、2ug の HA 蛋白を含むワクチン (総量 200ul/匹) を 3 週間隔で 2 回、マウスに皮下接種した。2 回目の免疫後 1 週目に採血し、HI 抗体および中和抗体価を測定した。

同様に、ワクチンで免疫した別の群のマウスに強毒型野生株 VNJP1203/2004 (H5N1) を感染させ、生残率を測定し、ワクチンの感染防御効果を調べた。

## C. 研究結果

- rg-A/VT/1194/2004 ワクチンは、Alm 添加、非添加にかかわらず採用した全ての抗原量 (2ug、0.2ug、0.02ug) ではどの群のマウスにおいても HI 抗体は検出できなかった。

- 同様に各群のマウス血清中の中和抗体を測定した。2ug、0.2ug の抗原量では、Alm 添加、非添加両群で僅かながら抗体上昇が見られた。一方、0.02 ug の抗原量では Alm 添加ワクチンのみに少量の中和抗体上昇が見られた。
- 強毒型野生株 VNJP1203/2004 をワクチン接種したマウスに感染させ、生残率を測定した。その結果、2ug Alm 添加ワクチンでは 100%、2ug 非添加ワクチンでは 80% のマウスが生存し、高い感染防御効果が見られた。一方、抗原量が 1/10 になると、Alm 添加群でのみ 50% を超える生存率が見られたが、非添加群では 30% と低い防御効果であった。
- 対照として、2003 年の H5N1 ヒト分離株から作製した Alm 添加ワクチン (rgA/HK/213/2003(+)) ワクチン) と抗体応答、感染防御効果を並行して比較した。その結果、rg-A/VT/1194/2004 ワクチンは Alm 添加においても、この対照ワクチンと同程度のワクチン効果を出すためには、少なくとも 10 倍以上の抗原量を必要とすることが示唆された。

## D. 考察

本実験の結果から、これまで我々が示してきたように、H5N1 ウイルス由来のワクチンには Alm を添加したアジュバントワクチンが有効であることが示された。さらに、2004 年のヒトから分離された H5N1 ウイルスから作製したワクチンは、

2003 年分離株由来のワクチン (rgA/HK/213/2003) に比べて、免疫原生、感染防御効果いずれにおいてもワクチン効果が著しく劣っていることが示された。WHO は本実験に用いた A/VT/1194/2004 株から作製した弱毒化ウイルス NIBRG-14 をプロトタイプワクチン株として推奨したことから、わが国も含めた世界中の先進国で NIBRG-14 を用いた H5N1 ワクチンの承認申請に向けた臨床試験が計画または実施されている。新型インフルエンザ発生時に短期間で承認を得るためのモックアップワクチンとして本株を使用することは、いたし方ない。しかし、本研究から得られた成績は、国家備蓄用のプロトタイプワクチンに NIBRG-14 株を用いることは、適当でないことを示しており、別の H5N1 分離株もプロトタイプワクチン候補として検討されるべきであることを示唆している。

#### E. 結論

H5N1 ウイルス由来のワクチンには A1m を添加したアジュバントワクチンが有効である。rg-A/VT/1194/2004 ワクチンは rgA/HK/213/2003 ワクチンより免疫原生、感染防御効果いずれにおいても効果は低い。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

R. O. Donis, Jean-Thierry Aubin, Saliha Azebi, Amanda Balish, Jill Banks, Niranjan Bhat, Rick A. Bright, Ian Brown, Philippe Buchy, Ana-Maria Burguiere, Hua-lan Chen, Peter Cheng, Nancy J. Cox, Aaron Curns, Frédérique Cuvelier, Guohua Deng, Julia Desheva, Stéphanie Desvaux, Nguyen Hong Diep, Alan Douglas, Scott F. Dowell, Nguyen Tien Dung, Lindsay Edwards, Keiji Fukuda, Victoria Gregory, Elena Govorkova, Alan Hampson, Nguyen Thi Hong Hanh, Scott Harper, Alan Hay, Erich Hoffmann, Diane Hulse, Masaki Imai, Shigeyuki Itamura, Samadhan Jadhao, Patricia Jeannin, Chun Kang, Jackie Katz, Jae-Hong Kim, Alexander Klimov, Yong-kuk Kwon, Chang-Won Lee n, Phuong Song Lien, Yi Pu Lin, Yanbing Li, Wilina Lim, Stephen Lindstrom, LaMorris Loftin, Jan Mabry, Taronna Maines, Jean-Claude Manuguerra, Masaji Mase, Yumi Matsuoka, Margaret McCarron, Marie-Jo Medina, Doan Nguyen, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi, Takato Odagiri, Malik Peiris, Jean-Marc Reynes, James Robertson, Claudine Rousseaux, Takehiko Saito, Somchai Sangkitporn, Jean-Louis Sarthou, Michael Shaw, James M. Simmerman, M. Slomka, Catherine Smith, San Sorn, Erica Spackman, Klaus Stöhr, David L. Suarez, Haan Woo Sung, David E Swayne, Maryse Tardy-Panit, Masato Tashiro, Pranee Thawatsupha, Terrence Tumpey, Timothy Uyeki, Phan Van Tu, Sylvie Van der Werf, Robert Webster, John Wood Richard Webby, Xiyan Xu, Guan Yi Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia Emerging Infectious Diseases 11, 1515-1521, 2005

Subash C. B. Gopinath, Tomoko S. Misono, Kazunori Kawasaki, Takafumi Mizuno, Masaki Imai, Takato Odagiri and Penmetcha K. R. Kumar An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion.

J. Gen. Virol. (in press)

Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro and Takato Odagiri Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Vaccine (in press)

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses Vaccine (in press)

小田切孝人 インフルエンザウイルス流行の予測は毎年どのようにして行うのか 日医雑誌 134, 1907-1910, 2006

## 2. 学会発表

Takato Odagiri Strain evolution of H5N1 avian influenza from Hong Kong 1997 to Vietnam/Thailand 2004/2005. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri Selection of vaccine strain for H5N1 influenza pandemic. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Masato Tashiro Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses Vaccine The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005

Takato Odagiri Development of H5N1 vaccine in Japan. US/Japan Cooperative Medical Science Program ARI Panel. 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Galveston, USA, January 24-25, 2006.

Takato Odagiri International responses of WHO influenza collaboration center in Tokyo on the outbreaks caused by highly pathogenic H5N1 avian influenza. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infectious Diseases-2006. Tokyo, February 19-20, 2006.

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザ：鳥インフルエンザの問題点と対策 平成 16 年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2月(2005)

小田切孝人 2004/05 シーズンのインフルエンザ流行解析と次シーズンのワクチン 平成 17 年度衛生微生物技術協議会。福井市、7月、2005

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第9回日本ワクチンワクチン学会 10月、大阪(2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人、駒瀬勝啓、多田善一、後藤修郎、池田富夫 インフルエンザパンデミックワクチン開発に関わる試作モックアップワクチンの調製およびその性状 第9回日本ワクチンワ

クチン学会 10月、大阪(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザから新型インフルエンザへ 第5回日本バイオセーフティー学会 横浜、11月(2005)

一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NKT細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンへの応用 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月(2005)

小淵正次、今井正樹、小田切孝人 B型インフルエンザウイルスBM2蛋白膜貫通領域の機能解析 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月(2005)

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、西藤岳彦、田代真人 2004/05シーズンのインフルエンザ流行株と平成17年度のワクチン株 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月(2005)

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 2004年H5N1型高病原性鳥インフルエンザ分離株を用いたアルムアジュバント添加弱毒化ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月(2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザへの対応ーワクチンの開発・準備 第53回日本ウイルス学会、横浜、11月(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザの現状と新型インフルエンザ対策 第3回東海北陸ブロック健康危機管理連絡協議会 名古屋、11月(2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザと新型インフルエンザ対策 平成17年度希少感染症診断技術研修会

国立感染症研究所 2月(2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
（分担）研究報告書

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

Programme of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010)

（分担）喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座教授

**研究要旨：** 2005年7月末にモンゴルのエルケル湖で野生水禽が大量に斃死した。モンゴル政府からその診断を依頼された。インドガンの脳ならびにオオハクチョウの脳および気管と総排泄腔の拭い液から4株のH5N1インフルエンザウイルスが分離された。ウイルス遺伝子および生物性状の解析結果から、5月に中国の青海湖で大量に斃死した野生水禽から分離されたウイルスと極めて近縁であることが判明した。2005年の9月から11月にかけて、北海道およびモンゴルで採集した野生水禽の糞便からウイルス分離を試みた。モンゴルの渡りガモの糞便476検体からは、H3N2、H3N6、H3N8、H4N6、H8N4、H10N3、H10N7ウイルス計32株が分離された。北海道の4地点で採集した1,248の野生水禽の糞便検体からは、H2N5、H3N2、H3N8、H4N2、H4N6、H6N1、H6N2、H8N4、H9N4、H12N2ウイルスが計26株分離された。これらのウイルスの性状を解析し、インフルエンザウイルス株ライブラリーに加えた。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りのうち、126通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。

#### A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザはアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、アフリカ諸国においても発生が報告され、被害が拡大している。現在流行しているH5N1亜型のウイルスによるヒトへの感染・死亡例も報告されており、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。インフルエンザウイルスに感受性がある動物としては、ニワトリ、カモ、七面鳥、馬、豚、ミンクなどが報告されている。また、ヒトを含む哺乳動物および鳥のインフルエンザAウイルスの遺伝子の起源は、カモなどの野生水禽のウイルスであることが今までの研究から明らかにされている。これらのことから、本研究は動物インフルエンザのグローバルサーベイランスを継続して実施し、分離同定されたウイルス株の抗原性、遺伝子性状、病原性を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

2005年夏、モンゴルのエルケル沼で多数の野鳥が斃死した。死亡したハクチョウおよびインドガンの臓器乳剤からウイルス分離を試みた。分離されたウイルスの抗原性

および遺伝子解析を行い、近年分離されたH5ウイルス株との相同性を比較した。

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からウイルス分離をした。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。HAおよびNAの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、これらのウイルス株のHA遺伝子の塩基配列を決定し、HA開裂部位のアミノ酸配列を解析した。

#### C. 研究結果

ハクチョウおよびインドガンの臓器乳剤からH5N1亜型のインフルエンザAウイルスが合計4株分離された。これらのH5N1亜型ウイルスの遺伝子を解析した結果、同年中国青海湖でインドガンから分離されたウイルスと近縁のウイルスであることがわかった。これらの分離株の1つ A/whooper swan/Mongolia/3/05(H5N1)をニワトリの静脈内に接種した結果、高病原性株であることが確認された。

野生水禽の糞便1,724検体から58株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH2、H3、H4、H6、H8、H9、H10、H12の8つの亜型に、NA亜型



はN1からN8までの8つの亜型に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りのうち、126通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。

#### D. 考察

モンゴルの湖沼において斃死した野鳥以外から高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されることはなかった。高病原性鳥インフルエンザウイルスが野生水禽とその営巣湖沼水の間で存続しているかを明らかにするために疫学調査の継続が必要である。

#### E. 結論

動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスは、動物とヒトのインフルエンザ対策に有益な情報とウイルス株を得ることができる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H (2005) Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. *Arch Virol*, 150: 1383-1392
- (2) Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T (2005) In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139
- (3) Takeda S, Sbagyo A, Sakoda Y, Ishii A, Sawamura M, Sueoka K, Kida H, Mukasa K, Matsumoto K (2005) Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen-antibody interaction. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 201-205
- (4) Bai G, Sakoda Y, Mweene AS, Yamada T,

Minakawa H, Kida H (2005) Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiol Immunol*, 49, 1063-1067

(5) Bai G, Sakoda Y., Mweene AS, Fujii N, Minakawa H and Kida H (2006) Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either Influenza A or B Virus infections. *J Vet Med Sci*, 68, 35-40

(6) Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park C-H, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H (2006) Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol*, 50: 73-81.

(7) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H (2006) Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol*, in press

##### 2. 学会発表

- (1) 「野生水禽から分離されたH7亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第140回日本獣医学会学術集会（2005年、鹿児島）
- (2) 「野生水禽から分離されたH7亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第53回日本ウイルス学会学術集会（2005年、横浜）

#### H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

## 外来性蛋白を発現する組み換え麻疹 AIK-C 株の確立

分担研究者 中山哲夫 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I 教授

### 【研究要旨】

麻疹ワクチン AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして利用するための基礎研究を行った。AIK-C 株の性状を分子生物学的に解明し、Fusion (F) 蛋白 278 位の Leu が Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40 度で増殖しない temperature sensitivity (ts) の性状は Phospho (P) 蛋白 439 位の Pro が担っていることがあきらかとなった。こうした弱毒のマーカーを保持し外来性蛋白を発現するウイルスベクターとして N/P, P/M, H/L junction に Asc I 制限酵素を導入し約 3000 塩基を挿入できる生ワクチンウイルスベクターを作製した。Reverse genetic の手法で感染性ウイルスを回収し P/M junction に導入したウイルスの回収率が高かった。ムンプスウイルスの Hemagglutinin-neuraminidase (HN) 遺伝子を挿入しムンプスウイルス HN 蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスを回収した。

### 【研究目的】

麻疹ワクチン AIK-C 株は既に 2000 万ドース以上がヒトに接種されその有効性と安全性は担保されている。AIK-C 株は Edmonston 株を羊腎細胞で継代し 32.5°C の低温馴化株を plaque cloning して樹立したワクチン株で Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40°C の増殖は 33°C の 1 万分の 1 という温度感受性 (temperature sensitivity; ts) を有している。これらの生物学的性状に関与する遺伝子を解析し、ワクチン株の持つ生物活性に関与する遺伝子を同定し、未だワクチンが開発されていないウイルス、現行ワクチンでは有効性・安全性に問題があるウイルスに対して、製造承認され広く使用され安全性の保証されている AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして外来遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作成する事を目的とした。

### 【研究方法】

- ① 細胞融合能の検討は F, H 発現プラスミドを構築し Vero, B95a 細胞に transfection し T7 RNA polymerase 存在下で細胞融合を観察した。
- ② 麻疹ウイルスの転写・複製能の解析には Mini genome assay を行った。麻疹ウイルスの leader, trailer 配列の間の N-L までの翻訳領域を luciferase 遺伝子に置換した麻疹ウイルス Mini-genome を作成した。Mini-genome cDNA から in vitro RNA transcription で

Mini-genome RNA を作成し N, P, L 発現プラスミドと共に細胞内に導入し、転写・複製活性は luciferase 活性で評価する事ができる。

- ③ 麻疹ウイルスは RNA ウイルスで遺伝子操作が困難であると言われてきたが全長 RNA を cDNA に変換し感染性ウイルスを回収する reverse genetics の技法が開発され、我々も AIK-C 麻疹ワクチン株をベースとした reverse genetics の技法を確立しワクチンデザインが可能となった。AIK-C 全長 cDNA の N/P, P/M, H/L junction に Asc I 制限酵素部位を導入し  $\beta$  galactosidase 遺伝子を導入した pAIK- $\beta$  gal N/P, pAIK- $\beta$  gal P/M, pAIK- $\beta$  gal H/L プラスミドを構築した。293T 細胞にキメラプラスミドと共に、感染性ウイルスを回収するために T7 RNA polymerase のもとで麻疹ウイルス N, P, L 蛋白を発現する helper plasmid を co-transfection させた。2 日後に麻疹ウイルスに感受性の高い B95a 細胞と co-culture を行い麻疹ウイルス特異的な CPE の出現を観察した。他の外来ウイルス遺伝子としてムンプスウイルス HN 遺伝子をクローニングして recombinant infectious clone を作成し感染性ウイルス回収を試みた。

### 【研究結果】

- ① AIK-C 株とその親株 Edmonston 株の H 蛋白では 5

カ所、F 蛋白では6カ所のアミノ酸変異が存在した。発現実験の結果 AIK-C F 蛋白をF 発現プラスミドとして用いたときに小さな細胞融合を示した。AIK-C と Edmonston のF 蛋白のキメラプラスミドを構築し AIK-C F 蛋白 278 位の Leu が small plaque inducibility に関与していることが明らかとなった。

② AIK-C 株は Edmonston 株から弱毒化され ts の性状を特徴としている。N, P, L 蛋白がウイルス遺伝子と共に RNP を形成し麻疹ウイルスの転写・複製活性を担っている。AIK-C, Edmonston 株から N, P, L 発現プラスミドを作製し Mini-genome assay を行った。AIK-C の P 蛋白発現プラスミドを用いたときには高温条件下での luciferase 活性を認めなかった。逆に Edmonston 株の P 蛋白発現プラスミドでは高温でも活性を示した。AIK-C と Edmonston の間には4塩基の核酸の変異を認めP蛋白で3アミノ酸、C 蛋白で1アミノ酸の置換を認める。これらのプラスミド間で組み換え体を作製し Mini-genome assay を行い P 蛋白 439 位の Pro が ts の性状を担っていることが明らかとなった。

③ AIK-C 全長 cDNA の N/P, P/M, H/L junction に AscI 制限酵素部位を導入し、 $\beta$  galactosidase 遺伝子を導入した pAIK- $\beta$  gal N/P, pAIK- $\beta$  gal P/M, pAIK- $\beta$  gal H/L の組み換え cDNA を作製した。感染性ウイルス AIK- $\beta$  gal N/P, AIK- $\beta$  gal P/M を回収出来たが、pAIK- $\beta$  gal H/L からは安定して感染性ウイルスを回収できなかった。

galactosidase を効率に発現しており麻疹ウイルス N 蛋白に対する monoclonal 抗体で染色すると麻疹ウイルス蛋白の発現も確認された。経時的にウイルス感染価を測定すると AIK- $\beta$  gal P/M のウイルスの増殖がよいことが明らかとなった(図 1)。

④ ムンプスウイルス HN 遺伝子を P/M junction に挿入し pAIK-MpHN を構築し感染性ウイルス AIK-MpHN を回収した(図 2)。

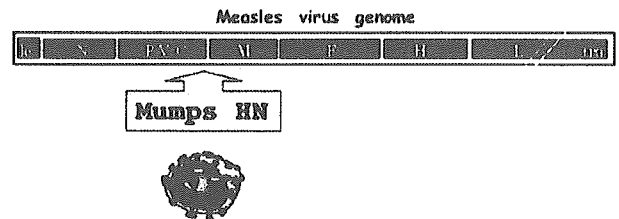


図2 ムンプス HN 遺伝子を挿入した遺伝子の構築

Vero 細胞に感染させ麻疹ウイルスに対する polyclonal 抗体で染色し麻疹ウイルス蛋白の発現が確認され、同時にムンプス HN monoclonal 抗体で HN 遺伝子の発現が確認された(図 3)。

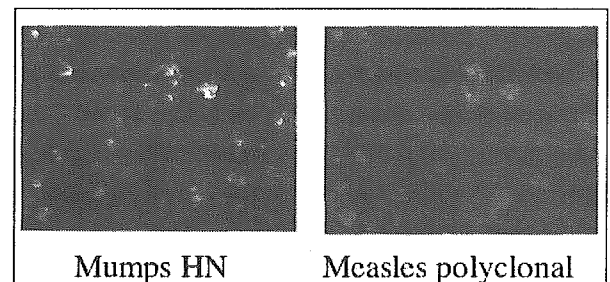


図3 組み換え麻疹ウイルスの麻疹ウイルス抗原、ムンプスウイルス抗原の発現

#### 【結論と考案】

麻疹ワクチンウイルス AIK-C 株を安全なウイルスベクターとして約 3000 塩基ぐらまで挿入可能であることがわかり、キメラワクチンウイルスとしての展開が可能と考えられる。外来遺伝子挿入部位としては P/M junction に挿入したプラスミドから感染性ウイルスの回収率がよかったことは、麻疹ウイルスの gene order に沿って mRNA の量が減少することから外来遺伝子が N/P junction に挿入される事で P 蛋白 mRNA の量が減少し翻訳される量が低下しウイルスに転写・複製活性に必要な N-P-L 複合体を形成するときの N, P 蛋白の比率に影響するものと考えられる。ムンプスウ

図1 AIK- $\beta$ -gal N/P と AIK- $\beta$ -gal P/M の増殖能

回収したウイルスを Vero 細胞に感染させ  $\beta$  galactosidase の発現を確認できた。AIK- $\beta$  gal P/M が  $\beta$

QuickTimey C?  
TIFFAILZWAJ 6LIIEVÉçÉOÉaEÁ  
ç™ç±çÄEsENÉ EÉç%â@çÉççç%ç...çÖikónç-çIAB

イルス以外にも Respiratory syncytial virus (RSV)の様に未だ有効なワクチンが開発されていないウイルス感染症に対する応用が考えられる。

【研究論文発表】

1. Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic methods for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43; 1625-1631, 2005.
2. Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J. Med. Virol.* 76; 241-247, 2005
3. Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Med. Virol.* 76; 406-413, 2005
4. Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Tecle T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song J-W, Kang C, Rota PA, Xu W, Featherstone D. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch. Virol.*(in press)
5. Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Med. Virol.* 77;121-127, 2005.
6. Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine* (in press)
7. Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* (in press)