

図 4

QuickTime[®] C²
TIFFAiatokC+CuAielEeEeEaEa
C™CzCAEsENE EEÇ%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKöVÇ-ÇIAB

2) 治療ガイドラインにもとづいた治療による耐性遺伝子変異に及ぼす影響の検討 (図 5)

治療ガイドラインにもとづいた治療選択を行った和歌山地区の急性中耳炎症例と治療ガイドラインを採用していない全国各施設より分離された肺炎球菌およびインフルエンザ菌について、*pbp* 遺伝子変異の頻度を検索し比較検討した。

① 肺炎球菌

3 遺伝子変異の頻度は両サーベイランスにおいても 42%と同一であったが、1a+X 変異株は和歌山地区サーベイランスにおいて極めて少ないことが判明した。その結果、遺伝子変異が認められない株は全国：7%、和歌山：21%と和歌山において著明に多い成績が得られた。

② インフルエンザ菌

lowBLNAR 株は両サーベイランスで約 35%と相違なかったが、全国サーベイランスでは highBLNAR 株が 35%、和歌山にて 5.6%と著明に少ない成績が得られた。その結果、遺伝子変異を認めない株は全国：31%、和歌山：57%と和歌山において有意に多い成績が得られた。

図 5

QuickTimey Ç²
TIFFAiallekÇ»ÇuAj eLi&EvÉçÉOÉaÉÁ
Ç™Ç±ÇÁEsENE EÉÇ%â@ÇÉÇzÇ¼Ç...ÇÖikóvÇ-ÇIAB

【結論】

本邦の小児における急性中耳炎をはじめとする急性上気道感染症の起炎菌(肺炎球菌、インフルエンザ菌)において、薬剤耐性化が急速に進行していることが判明した。和歌山地区では和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科感染・免疫研究班により 1996 年より急性中耳炎の検出菌に関するサーベイランスを開始しており、耐性菌の増加が危惧された 1998 年より治療ガイドラインを作成し、それにもとづいた治療管理を行ってきた。本研究により、ガイドラインにもとづいた適切な抗菌薬選択、とくに軽症には抗菌薬を使用せず、中等症以上の症例に対してもペニシリンを第一選択薬とした治療、さらに重症例には鼓膜切開による排膿を行う治療選択により、全国サーベイランスに比較して、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の両者において、有意な遺伝子変異の抑制が認められることが明らかとなった。今後もサーベイランスを継続することと、ガイドラインにもとづいた治療選択を行うことが耐性菌の抑制に継ぐことを広く情報提供することが重要である。

発表論文

1. Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Kobayashi I, Fujihara K, **Yamanaka N**. Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Feb;71(2):269-74.
2. Konno M, Baba S, Mikawa H, Hara K, Matsumoto F, Kaga K, Nishimura T, Kobayashi T, Furuya N, Moriyama H, Okamoto Y, Furukawa M, **Yamanaka N**, Matsushima T, Yoshizawa Y, Kohno S, Kobayashi K, Morikawa A, Koizumi S, Sunakawa K, Inoue M, Ubukata K. Study of nasopharyngeal bacterial flora. Second report. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in children aged 6 years or younger when administered antimicrobial agents. Part 2. *J Infect Chemother*. 2006 Oct;12(5):305-30. Epub 2006 Nov 6.
3. Konno M, Baba S, Mikawa H, Hara K, Matsumoto F, Kaga K, Nishimura T, Kobayashi T, Furuya N, Moriyama H, Okamoto Y, Furukawa M, **Yamanaka N**, Matsushima T, Yoshizawa Y, Kohno S, Kobayashi K, Morikawa A, Koizumi S, Sunakawa K, Inoue M, Ubukata K. Study of nasopharyngeal bacterial flora. Second report. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in children aged 6 years or younger when administered antimicrobial agents. Part 1. *J Infect Chemother*. 2006 Oct;12(5):287-304. Epub 2006 Nov 6.
4. Billal DS, Fedorko DP, Yan SS, Hotomi M, Fujihara K, Nelson N, **Yamanaka N**. In vitro induction and selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes* strains with multiple emm types. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jan;59(1):28-34. Epub 2006 Oct 25.
5. Hotomi M, Suzumoto M, Itahashi K, Nagura J, Fukushima T, Shimada J, Billal DS, Yamauchi K, Fujihara K, **Yamanaka N**. Efficacy of a novel oral carbapenem, tebipenem pivoxil (TBM-PI), against experimental otitis media caused by penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in chinchilla. *Vaccine*. 2006 Sep 20; [Epub ahead of print]
6. Suzumoto M, Hotomi M, Fujihara K, Tamura S, Kuki K, Tohya K, Kimura M, **Yamanaka N**. Functions of tonsils in the mucosal immune system of the upper respiratory tract using a novel animal model, *Suncus murinus*. *Acta Otolaryngol*. 2006 Dec;126(11):1164-70.

7. Yamauchi K, Hotomi M, Billal DS, Suzumoto M, **Yamanaka N**. Maternal intranasal immunization with outer membrane protein P6 maintains specific antibody level of derived offspring. *Vaccine*. 2006 Jun 19;24(25):5294-9. Epub 2006 Apr 4.
8. Konno M, Baba S, Mikawa H, Hara K, Matsumoto F, Kaga K, Nishimura T, Kobayashi T, Furuya N, Moriyama H, Okamoto Y, Furukawa M, **Yamanaka N**, Matsushima T, Yoshizawa Y, Kohno S, Kobayashi K, Morikawa A, Koizumi S, Sunakawa K, Inoue M, Ubukata K. Study of upper respiratory tract bacterial flora: first report. Variations in upper respiratory tract bacterial flora in patients with acute upper respiratory tract infection and healthy subjects and variations by subject age. *J Infect Chemother*. 2006 Apr;12(2):83-96.
9. 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
10. 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
11. 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.

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

成人における肺炎球菌ワクチンの効果的利用に関する研究

分担研究者 大石和徳、大阪大学微生物病研究所

研究要旨：84名の慢性肺疾患患者に対して、肺炎球菌ポリサッカライド(PV)を接種し、接種前と接種2年後まで血清を採取し、血清型6B, 14, 19F, 23Fの特異的IgG抗体濃度を第三世代ELISAで測定した。対象者の31%にPV接種に対する低応答者が存在し、これらの患者には初回接種後3年以内のPVの再接種が必要と考えられた。

2) ウガンダにおけるHIV感染者で末梢血CD4細胞数 $200-500/\mu\text{l}$ ($n=40$)、HIV感染者でCD4細胞 $500/\mu\text{l}$ 以上($n=30$)、Group HIV非感染者($n=30$)を対象とし、肺炎球菌コンジュゲートワクチン(CV)とPVを2ヶ月の間隔で一回ずつ接種し、接種前、CV接種後2ヶ月とPV接種後1ヶ月、CV接種8ヶ月後の血清中血清型14と4特異IgG抗体濃度と血清中オプソニン活性を測定した。アフリカにおける末梢血CD4が $200/\mu\text{l}$ 以上のHIV感染成人に対して、CV接種は肺炎球菌感染症の予防に有用であることが示唆される。

A. 研究目的

肺炎球菌は小児、成人における主要な呼吸器病原性細菌であり、成人においては慢性肺疾患患者やHIV感染者が高リスク群として知られている。肺炎球菌に対するワクチン戦略としては、肺炎球菌ポリサッカライドワクチン(PV)と肺炎球菌コンジュゲートワクチン(CV)があり、前者は成人に、後者は小児を対象として臨床応用されている。

本研究では、1) 本邦の慢性肺疾患患者におけるPV接種後の血清中特異IgG抗体産生応答とその維持、とりわけ低応答者について検討し、慢性肺疾患患者における今後のPV再接種の是非を明らかにする。2) ウガンダのHIV感染成人におけるCV接種とその後のPV接種後の血清中特異IgG抗体産生応答とその血清オプソニン活性の動態について検討し、CVとPVの連続

接種のHIV感染成人における有用性を明らかにする。

B. 研究方法

1) 慢性肺疾患84症例を対象とし、PV(ニューモバックス[®])の接種前と接種1ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後に血清を採取した。血清型6B, 14, 19F, 23Fの特異的IgG抗体濃度を第三世代ELISAで測定した。ワクチン接種後少なくとも一つの血清型のIgG濃度が前値の2倍以上である場合を応答者とし、4つの血清型すべてで抗体濃度が2倍以下の上昇にとどまる症例を低応答者と定義した。

2) 対象として、Joint Clinical Research Center, UgandaでGroup A: HIV感染者で末梢血CD4細胞数 $200-500/\mu\text{l}$ ($n=40$, 平均36.5歳)、Group B: HIV感染者でCD4細胞 $500/\mu\text{l}$ 以上($n=30$, 平均37.3歳)、Group C: HIV非感染者($n=30$, 平均27.1

歳)を登録した。ワクチン接種は、CV と PV を 2 ヶ月の間隔で一回ずつ接種し、接種前、CV 接種後 2 ヶ月と PV 接種後 1 ヶ月の血清中血清型 14 と 4 特異 IgG 抗体濃度と抗体のオプソニン活性を測定した。オプソニン活性の測定は分化した HL-60 細胞を用いて、WHO の推奨する方法で実施した。CV については、莢膜ポリサッカライドに無毒化ジフテリア毒素 CRM₁₉₇ をコンジュゲートした 7 価 CV (Prevnar[®]) を使用した。

C. 研究結果

1) 慢性肺疾患患者の90%以上の症例のPV接種前の血清中特異IgG濃度はいずれの血清型においても1 µg/ml以上であった。PPV接種1ヵ月後には、いずれの血清型においても特異IgG濃度は接種前に比較して有意に増加した。84症例中、26例 (31%)が低応答者であった。両群間において、年齢、性別、疾患頻度とステロイド使用頻度については差が認められなかった。低応答者ではPPV接種前の特異的IgG濃度が応答者より高い傾向が認められた。また、応答者ではPPV接種1ヵ月後の特異的IgG濃度がいずれの血清型においても有意に増加したのに対し ($P<0.01$)、低応答者では血清型14において血清型特異IgG濃度の有意な増加を認めたものの ($P<0.05$)、血清型6B、19F、23Fにおいて有意な増加は認められなかった。PPV接種後の特異IgG濃度は、PPV接種1ヶ月後から6ヵ月後までに速やかに減少した。特異IgG濃度が接種前のレベルに低下するまでの期間は、血清型6Bで0.5年、血清型19Fで0.6年、血清型23Fで1.7年、血清型14では6.9年であった。

2) CV 接種前の HIV 感染者の血清中 type 4 特異的 IgG 抗体濃度と血清オプソニン活性には相関が認められなかったが、HIV 感染者の血清中 type 14 特異的 IgG 抗体濃度と血清オプソニン活性には相関が認められた。CV 接種 2 月後の血清中 type 4 および type 14 特異 IgG 濃度は有意に増加し、血清中オプソニン活性との相関が認められた。また、オプソニン活性の増加は HIV 非感染者に比較して、HIV 感染者では低下しており、末梢血 CD4 数に依存していた。CV 接種後 2 ヶ月後に実施した PV 接種の 1 月後 (CV 接種 3 ヶ月後) の血清中特異 IgG 濃度とオプソニン活性の増加は認められなかった。さらに、CV 接種 8 ヶ月後の血清中特異 IgG 抗体濃度とオプソニン活性は低下傾向を示したが、HIV 感染者でも CV 接種前値以上を維持していた。

D. 考察

血清中の血清型特異的 IgG 濃度は PPV 接種 1 ヶ月後に有意に増加し、接種 6 ヶ月後までに急速に減衰した。血清型 14 に比較して、弱ワクチン抗原である血清型 6B、19F、23F では速やかな特異的 IgG の減衰が認められた。本研究の最も重要な所見は、応答者と低応答者における特異 IgG 濃度の動態が明らかに異なる点である。今回の成績は慢性肺疾患患者に対する初回接種後 3 年以内の再接種の必要性を示唆している。

HIV 感染者において、とりわけ末梢血 CD4 200/µl 未満の患者には HAART 療法の導入が推奨されている。従って、本研究は末梢血 CD4 200/µl 以上の HAART 療法導入前の HIV 感染者に対する肺炎球菌感染症の予防戦略としての意義がある。ウガ

ンダの HIV 感染成人では血清中 type 4 特異的 IgG 抗体濃度は HIV 感染者と同等であるが、そのオプソニン活性は低下しており、HIV 感染者の肺炎球菌に対する易感染性の一因と考えられる。CV 接種により、HIV 感染者においても血清中特異 IgG 抗体濃度とともにオプソニン活性は有意に増加し、CD4 数 200/ μ l 以上の HIV 感染者においては CV 接種により低オプソニン状態が解消され、さらに少なくとも 8 ヶ月は接種前値より高いオプソニン活性を維持することが明らかになった。また、CV 接種後に既に血清中特異 IgG 濃度は高値を示していたこともあり、T 細胞非依存性抗原である PV 接種によるさらなる血清中抗体濃度は増加が得られなかった。

E. 結論

1) 慢性肺疾患患者の 31 %に PV 接種に対する低応答者が存在し、これらの対象者には初回接種後の 3 年以内の PV の再接種が必要と考えられた。

2) アフリカの末梢血 CD4 が 200/ μ l 以上の HIV 感染成人に対しては、CV 接種は有用であると推察され、これらの対象者に対する CV 接種による肺炎球菌感染症に対する予防効果についての検証が待たれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S,

Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada K, Matsumoto K, and Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*, 11:429-436, 2006

2. Masaki H, Nagatake T, Asoh N, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe H, Oishi K, Rikitomi N, Matsumoto K. Significant reduction of nosocomial pneumonia after introduction of disinfection of upper airways using povidone-iodine in geriatric wards. *Dermatology*. 212(suppl1):98-102, 2006

3. 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* 134:1188-1194, 2006

4. Kurita S, Koyama J, Onizuka S, Motomura K, Watanabe H, Watanabe K, Senba M, Michael A, Apicella MA, Murphy TF, Matsushima K, Nagatake T, Oishi K. Dynamics of dendritic cell migration and the subsequent induction of protective immunity in the lung after

- repeated airway challenges by nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein. *Vaccine* 24: 5896-5903, 2006.
5. Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, and Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *Epidemiol Infect*, 2006.
6. Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawami K, Masaki H, Nagatake T, Sueyoshi Y, Iwanaga T, Aizawa M, Oishi K. Comparative immune response between responders and low responders in patients with chronic pulmonary diseases during the 2 year period after pneumococcal vaccination *Clin. Vac. Immunol* 14:139-145, 2007
7. Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, Oishi K. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. *Tohoku J Exp Med.* 211:63-79, 2007
8. 大石和徳. 急性呼吸器感染症(ARI)の今日的視点. *感染・炎症・免疫* 36(4) 266-273, 2006.
9. 肺炎球菌ワクチンによる肺炎制御戦略 大石和徳. *分子呼吸器病*. 10(6): 443-448, 2006.
10. 内田隆一、大石和徳. 新しいワクチンの開発. *総合臨床*. 55(12):2802-2807, 2006.
2. 学会発表
1. 大石和徳: 肺炎球菌ワクチンの現在と未来: 耐性菌克服のための戦略. 第54回日本化学療法学会総会, 京都, 2006年5月18-19日.
2. Oishi K, Chen M, Yoshimine H, Ssali F, Kityo C, Mugenyi P. Pneumococcal conjugate vaccine improves the reduced or impaired serum opsonic activity of HIV-infected adults. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Acute Respiratory Infections (ARI) Panel: January 21-23, 2007, Osaka, Japan
3. Furumoto A, Sueyashi T, Aizawa H, Okusa Y, Oishi K. Additive effects of pneumococcal polysaccharide vaccine in combination with influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Acute Respiratory Infections (ARI) Panel: January 22-23, 2007, Osaka, Japan
4. Oishi K. Acute respiratory infections in Asian countries. The 1st Thailand-Japan Forum on Infectious Diseases. Jan 29-30, 2007, Bangkok

Thailand

H. 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

フィリピンにおける麻疹ウイルス流行株に関する調査とウイルス性呼吸器感染症の疫学

分担研究者 押谷 仁 東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授

研究要旨

フィリピン・熱帯医学研究所を拠点とし、1)フィリピンで流行した麻疹ウイルスの遺伝子学的分類、2)RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)など地域で流行する急性呼吸器感染症起因ウイルスの疫学の解明を試みた。麻疹・風疹サーベイランスとして採取された患者血清のうち、麻疹 IgM が陽性であった検体より、麻疹ウイルスを PCR にて検出し塩基配列を同定したところ、すべての検出株が D3 lineage に分類された。インフルエンザサーベイランスとして提出された検体のうちウイルスが陰性であった検体より、ヒトボカウイルスを検出したが、hMPV は検出することができなかった。

1. フィリピンにおける麻疹ウイルス流行株に関する調査

1-A 研究目的

フィリピン熱帯医学研究所 (Research Institutes for Tropical Medicine, 以下 RITM) のウイルス部門は、フィリピンにおける麻疹および風疹の国家リファレンス研究施設に指定されている。この部門は、麻疹および風疹のサーベイランスの検査機関として、発疹をともなった発熱患者の血清から麻疹および風疹 IgM 抗体の検出を行っている。しかし、サーベイランスとして咽頭ぬぐい液や末梢血中リンパ球を採取しておらず、麻疹ウイルスの分離は行われていない。また、RITM では麻疹に対する遺伝子学的な検査をおこなうことができないため、血清中ウイルス RNA を用いた流行ウイルス株の遺伝子解析がおこなわれていない。そこで、患者血清より麻疹ウイルス遺伝子を PCR にて検出し、その遺伝子解析を行い、過去にフィリピンで流行した麻疹ウイルスの分生物学的疫学調査をおこなった。

1-B 研究方法

研究対象となったのは、発疹をともなった発熱患者のうち、2000年1月1日から2006年12月31日の間に、定点医療機関にて麻疹および風疹サーベイランスの対象として血液を採取された者である。集められた血清のうち、ELISA キットにて麻疹ウイルス IgM が陽性であった検体を各年 30 検体ずつ無作為抽出し、麻疹ウイルス遺伝子の検出を試みた。

マイナス 80 度に保存してあった血清より、PureLink Viral RNA/DNA キット (invitrogen) を用いてウイルスの RNA を抽出し、random primer にて complementary DNA (cDNA) を作成した。その後、cDNA を鋳型とし、麻疹ウイルスの H 遺伝子を増幅する Nested PCR をおこなった。アガロース電気泳動にて陽性であった場合、NP 遺伝子を検出する Nested PCR にて確認した。陽性であった PCR 産物を TaKaRa suprec-PCR をもちいて

精製し、BigDye terminator version 3.1 を用いてシーケンスをおこなった。決定した遺伝子塩基配列を GeneBank に登録してある標準株をもとに、Mega 3.1 にて系統樹作成をおこなった。

1-C 結果

7 年間の研究期間に、サーベイランスとして合計 9,347 検体が提出され、そのうち 7,699 検体 (82.3%) が麻疹 IgM 陽性であった (表 1)。2002 年まで年間約 2500 検体が提出され、うち陽性検体も 2000 検体あったが、それ以後減少し、2005 年には陽性検体を一例も認めなかった。これらの陽性検体のうち、2006 年は陽性であった全 3 検体、それ以外は毎年 30 検体を無作為に抽出し、合計 153 検体より麻疹ウイルスの検出を試みた。

表 1 麻疹・風疹サーベイランスにて麻疹が陽性であった検体数の推移 (RITM 2000-2006)

	陽性	陰性	判定不能	検査件数
2000	2,193	225	88	2,506
2001	2,143	357	165	2,665
2002	2,124	284	144	2,552
2003	1,081	82	62	1,225
2004	155	58	8	221
2005	0	71	0	71
2006	3	104	0	107
合計	7,699	1,121	467	9,347

ELISA による麻疹ウイルス IgM の検出結果

麻疹ウイルスの H 遺伝子が陽性であったのは、153 検体中 35 例であった。それらの 35 検体を、NP 遺伝子を増幅するプライマーにて Nested PCR を試みたところ、11 件が陽性であった。NP 遺伝子が陽性であった 11 検体の PCR 産物 (533bp) の塩基配列を、Genebank に登録してあ

る標準株と比較したところ、これらの株はすべてクラスター D3 に分類された (図 1)。

1-D 考察

今回の調査より、フィリピンで 2000 年から 2004 年の 5 年間に流行していたのは、D3 リニアージの麻疹ウイルスであることが推測された。過去 RITM からオーストラリアに送って分離された麻疹ウイルスも D3 リニアージであったと報告されており、我々の結果と一致する。WHO によると、1995 年から 2006 年に D3 リニアージ株を分離・報告しているのが、フィリピンとパプアニューギニアのみであることより、D3 リニアージがフィリピンに特有な株であった可能性がある。しかし、遺伝子型検索の対象となりえた検体が少ないことより、これらの結果が流行株を反映していないことも考えられる。この分子生物学的データは、今後麻疹の流行の再発が見られた場合 Indigenous circulation によるものか、あるいは海外からの持ち込みによるものかを判断するための基礎データとして重要となる。

IgM が陽性であった検体からは、H 遺伝子を検出する nested PCR のスクリーニングにて 35 (23%) 検体が陽性であった。この検出率は、検体が採取された時期が必ずしもウイルス血症をきたしている急性期とは限らないことを考慮すると、妥当な数であると考えられる。また、麻疹ウイルスはリンパ球に親和性があることより、血清が PCR 用の検出として最適とは言い難い。今後ウイルス分離を行う際には、咽頭ぬぐい液もしくはリンパ球の採取が必要となってくる。

2004 年を境に、検体数が減少していた。その背景には、2004 年 2 月に、フィリピン全土で行われたキャンペーン“LIGTAS TIGDAS”が寄与していると考えられる。これはマズワクチンキャンペーンであり、ワクチン接種歴や罹患の有無にか

かわらず、1996年2月1日から2003年の5月1日の間に生まれた小児全員がワクチン接種の対象となった。集団免疫を今後も維持するには、このようなキャンペーンの定期的な施行が重要であると考えられる。

2005年は陽性検体が0であり、2006年は3件のみであった。しかし、現行のサーベイランスでは古典的な麻疹患者しか検出できないことを考

えると、これらの数値がフィリピンにおける麻疹の発生状況を正確に反映しているとは考えにくい。今後は、ウイルスを分離に視野に入れた、サーベイランス体制が必要であると考えられる。

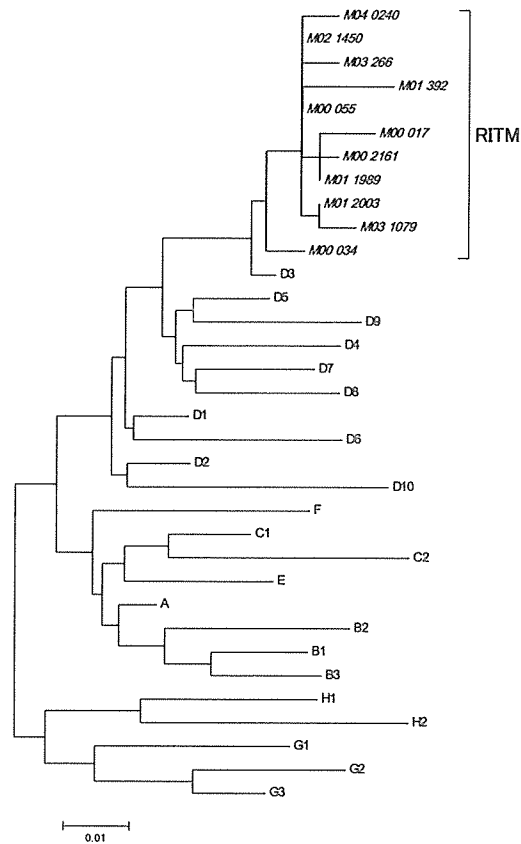


図1 麻疹ウイルス NP 遺伝子により系統樹

NP 遺伝子 533bp をもとに、Mega の Neighbor-Joining 法にて作成。

RITM で検出されたウイルスは、すべて D3リニアージに分類された

2. フィリピンにおけるウイルス性呼吸器感染症の疫学

2-A 研究目的

熱帯における呼吸器感染症 (acute respiratory infection、以下 ARI) ウイルスの疫学は依然不明な点が多い。一方、あらたな ARI ウイルスが、分子生物学的アプローチより相次いで発見されている。ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus、以下 hMPV) は 2002 年にオランダで発見され、温帯では季節性をともなった下気道炎の起因病原体であるとされている。また、2005 年にスウェーデンで発見されたヒトボカウイルス (human bocavirus、以下 HBoV) も、ARI の起因病原体と考えられている。しかし、このような新しい ARI ウイルスの熱帯における疫学は、まだ明らかになっていない。フィリピンでは、国家インフルエンザセンター (National Influenza Center) である RITM が中心となりインフルエンザサーベイランスを行っているが、インフルエンザ以外の ARI ウイルスの疫学はほとんど明らかになっていない。そこで我々の研究は、インフルエンザサーベイランスで集められた検体より、代表的な ARI ウイルスとして RS ウイルス、新しい ARI ウイルスとして hMPV および HBoV を PCR にて検出し、それらの疫学を明らかにすることを目的とした。

2-B 研究方法

フィリピンにおけるインフルエンザサーベイランスは、発熱性の呼吸器症状 (Flu-like illness) にて国内 12 の定点医療機関を受診した患者を対象にしており、RITM に輸送されてきた咽頭ぬぐい液からのインフルエンザウイルスをはじめとする ARI ウイルスの分離を行っている。今回の研究は、2006 年 1 月から 9 月の間に、マニラ近

郊の Muntinlupa にある Tunasan Health Center から提出された検体のうち、MDCK 細胞および HeP2 細胞を用いたウイルス分離にて陰性であった検体を対象とした。ウイルス RNA および DNA を抽出は PureLink RNA/DNA キット (invitrogen) にて行い、RNA ウイルスの検出にはランダムプライマにて作製した complementary DNA を、DNA ウイルスの場合は抽出物をそのまま PCR の鋳型として用いた。PCR は、RS ウイルスと hMPV では各ウイルスの NP 遺伝子、HBoV では NP1 遺伝子を増幅するプライマーを使用した。アガロース電気泳動にて陽性であった PCR 産物について、Gene Analyzer 3130 および BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) にて塩基配列を同定し、Mega3.1 にて系統樹を作製した。

2-C 研究結果

対象となった 99 検体のうち 1 件が RS ウイルス陽性で、同定された塩基配列よりサブタイプ A に属することがわかった。hMPV ウイルスは、F 遺伝子、NP 遺伝子をターゲットとした PCR を行ったが、いずれの検討においてもすべて陰性であった。HBoV は、3 例において、NP1 遺伝子のおよび VP1-VP2 領域を増幅する PCR にて陽性であった。それらの PCR 産物の塩基配列を同定したところ、Genebank に登録されている株と塩基レベルで 98 から 99%、アミノ酸レベルで 99 から 100% の相同性があった。VP1-VP2 領域の部分遺伝子 (406bp) を、スウェーデン、アメリカ、南アフリカ、日本、中国、タイで検出された Genebank 登録株と比較したところ、検出された三株はひとつのグループを作っていた。

2-E 考察

今回の検討では、1 検体のみではあるが RS ウイルスを PCR にて検出した。RITM のウイルス分離工程において HeP2 細胞を用いていることより、理論的には RS ウイルスの分離が可能である。このようなウイルス分離と PCR 結果の乖離の原因として、検体の採取から培養細胞への接種までの間にウイルスが失活してしまった可能性が考えられる。これは、熱帯における感染症の調査を行う上で無視できない問題であり、これらの点の改善により全体のウイルス分離効率を上げることが可能となる。

hMPV は、温帯において RS ウイルスと同様な季節性をもっていると考えられているが、今回の検討では hMPV を検出することができなかった。検体の採取期間が 1 月～9 月と限定されているため、今後はさらに採取期間を延ばし通年での検討が必要であると考ええる。

今回の調査では、熱帯であるフィリピンにおいて、はじめて HBoV の存在を確認した。このウイ

ルスは、2005 年にはじめて報告された Parvovirus であり、呼吸器感染症の起因ウイルスであると考えられている。HBoV が地域で流行するのか、あるいは偏在するウイルスなのかは、報告書作成時点で検体情報が不足しているため、考察ができない。今回検出した 3 株は VP1-VP2 部分遺伝子による系統樹上で一つのグループをつくっていたが、比較対象とするデータが少ないことよりウイルス株の地域局在に関してはまだ結論づけることはできない。また、HBoV がどの程度の病原性をもっているか、まだ議論の余地がある。今回の検討では患者情報の入手ができなかったため、罹患者のリスクファクター、臨床症状などについては、考察ができない。病因論については、適切な対照群をもちいた研究が必要であると考ええる。

フィリピンにおける、ARI ウイルスの疫学を明らかにするには、研究対象期間を延長し、患者情報も収集しての検討が必要であると考ええる。

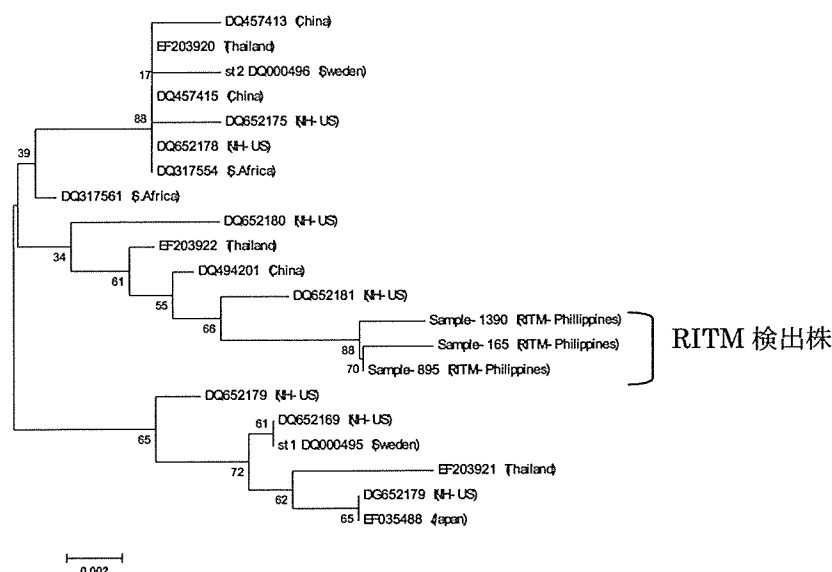


図2 Human Bocavirus VP1-VP2 部分遺伝子(406bp)による系統樹。

Mega の Neighbor-Joining 法にて作成。図中にある株の名称は Genebank の accession number で、括弧内に検出された国名を記した。

研究発表

1. 論文発表:無し
2. 学会発表:無し

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:無し
2. 実用新案登録:無し
3. その他:無し

分担研究報告書

H5N1 高病原性鳥インフルエンザ感染診断における国際協力

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 H5N1 高病原性鳥インフルエンザの流行の中心である東南アジア諸国は、実験室感染診断系の構築およびその精度管理面において、機材、試薬等設備的に恵まれていないことに加えて、実験担当者の知識、技能レベルにおいても大きく立ち遅れている。このために、これら流行国へは先進諸国からハード、ソフト両面からの支援が不可欠である。本研究においては、前年度に鳥インフルエンザの現地調査を行なった国から検査ラボ担当者を国立感染症研究所へ招聘して、診断系の構築および技術移転のための研修を3週間にわたり行なった。さらに、東南アジアから送付された鳥インフルエンザ感染疑い例患者検体について診断検査を行い、WHOのH5N1 鳥インフルエンザ診断ラボとして国際貢献した。

研究協力

今井正樹、影山努、二宮愛、氏家誠、
小淵正次、板村繁之、田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部第1室）
篠原克明、杉山和良（国立感染症研究所
バイオセーフティー管理室）
中嶋健介（国立感染症研究所国際協力室）

A. 研究目的

東アジア諸国の家禽で流行が始まった H5N1 高病原性鳥インフルエンザ(H5N1-HPAI)は、3年が経過した現在ではユーラシア大陸全域に広がり中国、ロシア、モンゴル、中東、ヨーロッパ、アフリカまで流行が波及していることが確認されている。これらの国では家禽は養鶏場のように集中飼育されたものは少なく、大多数は裏庭飼育であり、このため H5N1-HPAI ウイルスの蔓延規模を正確に把握することは不可能である。また、本ウイルスはこれらの地域では家禽に定着してしまっていることから、H5N1-HPAI の流行を制御し封じ込めることはもはや不可能となっている。

一方、ヒトでの感染例も家禽での流行と並

行して増加の一途をたどり、現時点で12カ国 277 人の感染例と 167 名の死亡が確認されている。これら感染者の多くは依然として東南アジア諸国に多く、この地域が H5N1-HPAI に由来する新型インフルエンザの発生源となる可能性が懸念される。

しかし、これらの地域は感染診断に用いる機材の不足や技術面で大きく立ち遅れている場合が多く、新型インフルエンザ対策の一環として先進諸国からハード、ソフト両面での国際支援が必要である。

本研究では、前年度に鳥インフルエンザの流行状況および感染診断担当機関の施設面および検査担当者の技能等について現地調査を行った結果を元に、支援すべき国と機関を選定し、検査担当者を国立感染症研究所ウイルス第3部へ招聘し、3 週間におよぶ技術研修を実施した。これらの国際協力をとおして今後の東アジア地区における鳥インフルエンザおよび新型インフルエンザ対策への貢献することを目的とした。

B. 研究方法

- ・ H5N1 遺伝子検出検査。国立感染症研究所ウイルス第3部が2006年6月に改訂した高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアルを用いて、コンベンショナル RT-PCR、Real-time RT-PCR、H5-LAMP 法による H5N1 遺伝子検出検査を実施した。
- ・ 遺伝子検出検査法の精度管理および実験室内交叉汚染防止のための実験系構築について討議した。
- ・ MDCK細胞および孵化鶏卵を用いたウイルス分離法の練習を行った。
- ・ BSL3 実験室の使用法と注意事項についてバイオセーフティー講習を実施し、それにしたがって、BSL3 実験室内での診断検査の練習を行った。
- ・ 研修参加国における鳥インフルエンザの現状と検査体制および新型インフルエンザ対策と今後の課題について議論した。

C. 研究結果

1. 現地調査

2006年3月末に東南アジア諸国の中で、H5N1 高病原性鳥インフルエンザの発生が見られていない、または発生報告数が少ない国を中心にサーベイランス状況、検査機関の現状について現地調査を行った。調査国として訪問した国は、ミャンマー、ラオス、カンボジア、インドネシアである。特に、検査診断ラボについては設備面および診断系の構築状況を入念に調査し、実験室内交叉汚染を避けるための適切な機材の配置および検査の流れについて検討した。また、検査実施担当者と面談し検査技能について間接的な評価を行った。

2. 技術支援対象国の選定。

技術研修開催案内に対して参加希望の返答があったミャンマーから2名、カンボジアから1名、ベトナムから1名を招聘した(添付資料)。

3. 技術研修

- ・ H5N1 遺伝子検出検査。
遺伝子検出検査には国立感染症研究所ウイルス第3部が2006年6月に改訂した高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアルを用いた。本マニュアルは現在流行している4種類のグループに入る H5N1-HPAI ウイルス全てを高感度に検出できる改良版プライマーを採用していることから、現時点での H5N1-HPAI 感染診断にとっては、最も有用性の高いものである。また、参加国の検査施設の設備状況を踏まえて、少なくとも3種類の検査法(コンベンショナル RT-PCR、Real-time RT-PCR、H5-LAMP)による実習を行った。

- ・ 検査精度の検証

採用しているプライマーの感度を最大限に発揮させるための、検査精度管理について議論し、問題発生時の解決法についても討議した。また、実験室内交叉汚染防止のための検査系の構築法、検査の流れなども討議した。

- ・ ウイルス分離、培養法の研修

BSL3 実験施設が備わっているラオス、ベトナムでは、近い将来に H5N1-HPAI ウイルス分離も可能となり、当該施設での操作法を含めたウイルス分離技術の習得が必要である。分離は MDCK 細胞および孵化鶏卵を用いた方法を練習した。

4. ラオスから依頼された H5N1-HPAI 感染疑い例検体の検査。

2006年4月にラオスから H5N1-HPAI 感染疑い例 28 検体について検査依頼を受けた。遺伝子検出検査として RT-PCR によるタイプ A、H5 検出検査および並行して H5-LAMP も実施した。いずれも陰性であり、インフルエンザ感染が否定された。一方、残りの検体を nested RT-PCR によりピコルナウイルス遺伝子検出を行った結果、ライノウイルス陽性3件が検出された。

これら検査結果は速やかにラオスに還元され、同時に WHO-H5 ネットワークメンバー国

へも報告し情報共有された。

D. 考察

東南アジア諸国では H5N1-HPAI ウイルスが家禽の間で定着していることから、流行が頻発し、それに伴って人への感染例も継続的に発生する。2004～2005 年の流行の中心であったベトナムは、検査系の構築や担当者の知識、技能はかなり高くなっている。しかし、他の参加国は今後も集中的に支援を継続しなければ、安定した検査系を構築するのは難しいと思われる。本研修を通じて構築できた友好関係を継続し、定期的な援助とアドバイスをすることが必要である。

E. 結論

H5N1-HPAI ウイルスが蔓延している東南アジア諸国は、国ごとに検査技術の格差大きく、継続的な支援が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 87, 479-487, 2006

Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*.

24(17):3669-76, 2006.

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* 10, 6679-6682, 2006

Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J. Virol. Method* (in press)

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. *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

小田切孝人 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザと新型インフルエンザに備えた事前準備と国際協力 *ウイルス* 56, 77-84, 2006

小田切孝人、今井正樹、二宮愛、峰川晴美、納富継宣、田代真人 ランプ法による H5N1 高病原性鳥インフルエンザの診断 *インフルエンザ* 7, 201-209, 2006

小田切孝人 リバーズジェネティクスによる弱毒化 H5N1 鳥インフルエンザワクチンの開発と応用 日本臨床 64, 1855-1864, 2006

小田切孝人 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの最近の動向と国家備蓄ワクチンカレントセラピー 24, 27-33, 2006

2. 学会発表

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 18 年度鹿児島県職員臨床検査技師技術研修会 鹿児島 6 月 9 日 (2006)

一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 日本ワクチン学会 大阪 10 月 (2006)

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2005/06 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 18 年度のワクチン株 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典子、川口晶、岩田奈緒子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の感染防御効果 第 54 回日本ウイルス学

会、名古屋、11 月 (2006)

影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、板村繁之、小淵正次、小田切孝人、田代真人 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス拡散検出検査系の構築 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

今井正樹、二宮愛、川崎一則、小田切孝人 B型インフルエンザウイルスの感染性粒子形成過程における BM2 蛋白質の役割 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

二宮愛、今井正樹、多田善一、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 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

Takato Odagiri, Masaki Imai, Tsutomu Kageyama, Ai Ninomiya, Makoto Ujike, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Masato Tashiro Generation and update of laboratory diagnosis systems for H5N1 highly pathogenic avian influenza. US-Japan CMSP Singapore Conference, November, 2006.

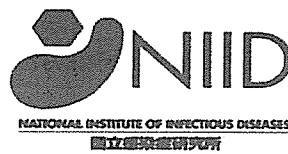
小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザと新型インフルエンザ対策 平成 18 年度稀少感染症診断技術研修会 2 月 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Laboratory diagnosis and biosafety training workshop for H5N1 highly pathogenic avian influenza

February 26-March 16, 2007

Organized by Laboratory of Influenza Viruses, Department of Virology 3,
National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo Japan.



Objectives

1. To discuss and increase understanding of responsibilities on the outbreaks with H5N1 highly pathogenic avian influenza among the countries of participants.
2. To train and skill up participants from laboratory techniques for strain surveillance and diagnosis of H5N1 highly pathogenic avian influenza.
3. To exercise laboratory works in biosafety level 3 room.
4. To develop and strengthen the correlation between the participant's institutes and NIID.