

を採用した検査キットでは異なるクレードのウイルスを見逃すことになる。そのために、全ての H5N1 流行株を確実に捉える遺伝子検出用プライマーの再設計とキットを緊急に開発する必要が出てきた。

感染研ウイルス 3 部インフルエンザウイルス室では、このような流行状況に対処するために、新たにコンベンショナル RT-PCR 系、Real-time RT-PCR 系および H5-LAMP からなる遺伝子検出診断系を開発した。本研究では、その概略と成果について報告する。

B. 研究方法

1. RT-PCR プライマーの改良

クレード 1 およびクレード 2.1~2.3 に分類される H5N1 鳥インフルエンザ流行株を検出できるように、RT-PCR に用いるプライマーを再設計した。また、従来の two-step PCR 法から one-step 法に改良し、反応系を簡便化した。

2. Real-time RT-PCR 系の構築

上記の RT-PCR 用プライマーをそのまま使用できる SYBER Green I 法を採用した系を開発した。

使用機器としては、世界中に広く普及しているロッシュ社のライトサイクラーおよびパイオラド社のクロモ 4 で至適化した。

3. H5-LAMP 検査キットの評価

前年度に開発した H5-LAMP キットは現行の流行株にどの範囲まで対応できるか、各種クレードウイルスとの反応性を検討した。

C. 研究結果

1. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ遺伝子診断法の改良

高病原性鳥インフルエンザウイルス A/H5N1 は、1997 年に香港で流行して以来、中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと現在は流行地域が拡大している。この間にも、A/H5N1 流行株は抗原

的にも遺伝的にも異なる数グループに分岐し、従来のプライマーを用いた遺伝子診断法では検出できない株も出現してきた。そこで、様々なインフルエンザウイルス A/H5N1 流行株に対し、新たに幅広く高感度に検出できるプライマーの設計および検査法の開発を行った。

RT-PCR 法では、現在、我々が感染研 HP に掲載している RT-PCR 検査法(第 2 版)を大幅に改訂し、2004 年のベトナム株、2005~2006 年にかけて流行したインドネシア株、トルコ株など遺伝的に異なるグループに入る株でも高感度に検出できる検査系の構築に成功した。

RT-PCR と同じプライマーを採用した SYBR Green I 法を用いた Real-time RT-PCR 検出系も同時に開発した。

これらの詳細を記載したマニュアルは、病原体検査マニュアル「高病原性鳥インフルエンザ」(2006 年 6 月改訂版)として全国の地方衛生研究所検査担当者へ配布された。さらに、全国主要検疫所職員を感染研に招聘し、本マニュアルを用いた検査法の研修を行った。これによって、国内で同ウイルスによる流行が発生した場合は、感染診断検査を担当部署で迅速に行うことが可能となっている。

一方、WHO の診断検査マニュアルの改訂が進められているが、感染研の最新版遺伝子検査法が世界の標準検査マニュアルとして採用されることが検討されている。

2. H5-LAMP 検査キットの評価

感染研と栄研化学とで共同開発し市販されている H5-LAMP 検査キットが、現行の複数のクレードの H5N1 流行株全てに対応可能か否かを検証した。その結果、クレード 1 およびクレード 2.1 (インドネシア株)には高感度に反応するが、それ以外のクレード 2.2、2.3 との反応性は顕著に低下することが判明した。

現在、反応性が低いクレードのウイルスに高感度に反応するようにプライマーおよび反応液組成等の改良を行っている。

D. 考察

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行は制圧できないことから、今後も家禽での流行は頻発することが予想される。これと並行して人への感染例も増え続け、抗原性も遺伝子配列も異なる H5N1 ウイルスがどんどん出現してくるものと思われる。新型インフルエンザ対策の上では、流行株の性状や変化を適宜捉えるために、正確な感染診断を行うことが求められ、それに対応できる検査キットや試薬類の開発が期待されている。

特に、遺伝子検出検査系では、流行株に対して想定している検出感度が維持できているかを常に把握しておく必要がある。そのために、複数種の検査法を確立しておき、それらの利点および欠点をよく理解し、上手に組み合わせて最高の検出感度で診断検査を実施することが大切である。

本研究において改良され、さらに新たに構築された検査法は今後新しい H5N1 ウイルスが出現するたびに更新していくことになる。それらの情報は随時関連諸機関と共有され、新型インフルエンザ対策の上で有効活用されることが望まれる。

E. 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 リバース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 CMSPP 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)

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ノイラミニダーゼ阻害剤投与を受けた患者から分離されたインフルエンザウイルスの阻害剤感受性試験

分担研究者 西藤 岳彦
農業・食品産業技術研究機構 動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム
協力研究者 鈴木 宏、齋藤 玲子
新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生分野

研究要旨 2002/03、2003/04、2004/05、2005/06 インフルエンザシーズンにノイラミニダーゼ阻害剤によるインフルエンザ治療を受けた患者計 42 名の治療前後に分離されたウイルスを用いて、ノイラミニダーゼ阻害剤感受性試験を行った。一症例において、投与後に分離された H3 インフルエンザウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害剤 (GS4071) の 50% 阻害濃度が、投与前に分離されたものより上昇していることが示された。

A. 研究目的

わが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤の使用数は、2001 年のタミフル、ザナミビアーの販売認可以来激増の一途をたどっており、ノイラミニダーゼ阻害剤の処方数は現在世界第一位である。ノイラミニダーゼ阻害剤による耐性株の出現率は、別の作用機序を持つ抗インフルエンザ剤アマンタジンよりも低いとされている。一方で、昨年度の我々の調査によって、インフルエンザシーズン中に市中から分離される流行株の中に低頻度ではあるが、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する 50% 阻害濃度が他の株に比べ上昇している株が存在することが示された。また、Kiso らの報告 (Lancet 2004, 364 759-765) においては、乳幼児で従来考えられていたよりも高率にノイラミニダーゼ阻害剤耐性株が出現する可能性が指摘されており、同薬剤による治療に伴う薬剤耐性株の出現頻度のモニターの重要性が高まっている。

ノイラミニダーゼ阻害剤耐性機序の研究は主に、免疫不全状態の患者における持続感染状態で分離さ

れた耐性株や、*in vitro* での選択により分離された耐性株を用いて行われており、耐性を規定するノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子のアミノ酸置換に関する情報はこれらの耐性株から得られたものが多い。現在のようにノイラミニダーゼ阻害剤の処方がインフルエンザ治療の一般的な治療法となるにしたがって、免疫学的健常者から耐性株が分離される可能性が高まってきており、これらの免疫学的健常者から分離される耐性株がこれまでに知られている耐性株と同様の遺伝子型、表現型を示すか否かは非常に重要な問題である。

本研究では、一般医療機関をインフルエンザで受診し、ノイラミニダーゼ阻害剤治療を受けた患者を対象にノイラミニダーゼ阻害剤による治療前と治療後にインフルエンザウイルスの分離を行い、分離されたウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害剤タミフル活性体 (GS4071) のノイラミニダーゼ活性 50% 阻害濃度 (IC50) を蛍光色素法を用いて測定した。

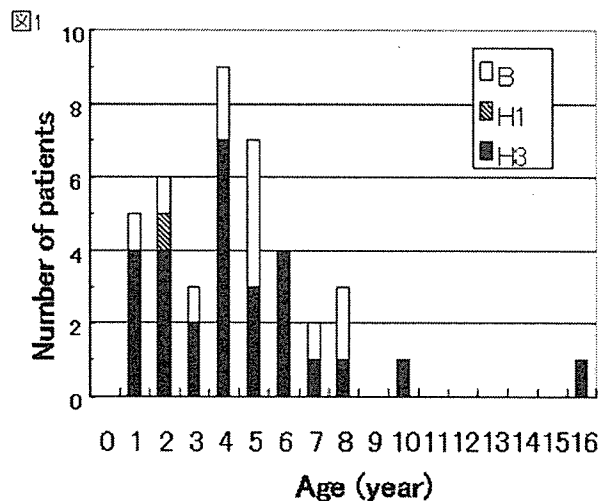
B. 研究方法

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生分野において 2002/03、2003/04、2004/05、2005/06 インフルエンザシーズンにインフルエンザ感染により医療機関を受診した患者を対象とし、ノイラミニダーゼ阻害剤治療前の検体からのウイルス分離を行った。また3-4日のノイラミニダーゼ阻害剤投与期間後に再診に訪れた患者からも検体を採取し、ウイルス分離を行った。

ノイラミニダーゼ阻害剤であるタミフル活性体 (GS4071) のノイラミニダーゼ活性 50%阻害濃度は、蛍光基質 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)を用いた蛍光測定法によって測定した。陽性対照として、H1亜型は A/Texas/36/91 親株および H274Y 変異株、H3 亜型は A/Texas/131/02 親株および E119V 変異株、B型は B/Memphis/20/96 親株および R152K 変異株を用いた。

C. 研究結果

今回得られた検体は、乳幼児を中心に1歳から16歳までの年齢層にわたり(図1:一検体年齢不詳)、分離ウイルスの亜型はH1 1, H3 29, B型 12の計42組84株を用いて解析を行った。



すべての分離ウイルスについて、タミフル活性体 (GS4071) の 50% 酵素阻害濃度を測定した (図 2)。

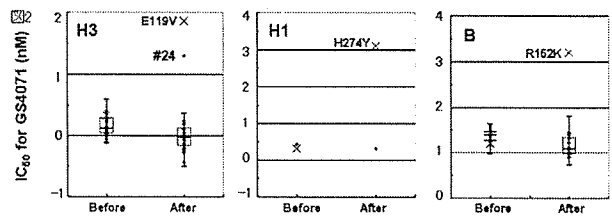


図 2 に示されるように、治療前に分離されたウイルス群 (Before) と治療後に分離されたウイルス群 (After) では、IC₅₀ の平均、分散等に有意な変化は認められなかった。しかし、#24 で示される患者から分離されたウイルスでは投与前に分離されたウイルスと投与後に分離されたウイルスの間で明らかな IC₅₀ の変化が認められた (図 3)。

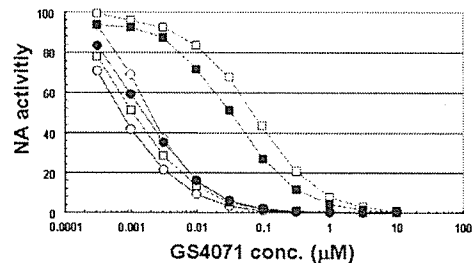


図 3 に示されるように #24 の患者から分離された治療前後のウイルス (24 および 24T) の IC₅₀ を比較したところ、GS4071 の IC₅₀ が 1.63nM (治療前ウイルス) から 19.9nM (治療後ウイルス) に分離されたウイルスで IC₅₀ 値が 12 倍に上昇していた。

D. 考察

今回検討した投与前後に同一患者から分離された 42 組のウイルスのうち、一組のウイルスにおいて投与前後に IC₅₀ の明らかな変化が認められた。このウイルスは 2003/2004 年シーズンにタミフルの 4 日間投与を受けた 6 歳児から分離された H3N2 亜型ウイルスであった。

今回の検討でノイラミニダーゼ阻害剤投与後の小児患者から、低頻度ではあるが耐性株が分離されることが確認された。今後、さらに検体数を増やし、ノイラミニダーゼ治療に伴う耐性株の出現頻度をモ

ニターしていくことが重要であろう。また、分離された耐性ウイルスの遺伝子解析を行い、耐性獲得の機序を解明することも重要な課題である。

E. 結論

2002年から2006年にかけて、ノイラミニダーゼ治療を受けた小児科受診患者42例のうち1例から分離された治療前後のウイルス間で、ノイラミニダーゼ阻害剤のIC50値の変化が認められた。この患者から治療の前後に分離されたウイルスにたいするGS4071のIC50は、治療前ウイルスが1.63nMであったのに対して、治療後ウイルスでは19.9nMであった。

F. 健康危機情報

特記事項無し。

G. 研究発表

なし

厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

「新型インフルエンザへの事前準備と大流行発生時の緊急対応計画に関する研究」

分担研究者 東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授 押谷 仁

研究要旨

研究1) 新型インフルエンザ対策を考える上で必要なインフルエンザ感染そのものに関する基本的なエビデンスが欠けている。これまで存在する Personal Protection の Evidence に関する Review を行った。研究2) インフルエンザ対策として、早期封じ込めや Mitigation Strategy が最近考えられているが、日本で実施可能であるかどうか検討されていない。そこで、日本における新型インフルエンザ対策実施に当たって、海外の感染モデルによるシミュレーションをもとに、問題点を整理した。研究3) インフルエンザウイルスの感染経路等に関する具体的な Evidence を得るため、二つの異なるウイルス学的研究の準備を行った。

研究1. インフルエンザの Personal Protection に関する Evidence

日本では習慣的に、インフルエンザ対策としてマスクの使用、手洗い、うがいなどが行われているが、基本的なエビデンスが欠けている。そこで、インフルエンザの Personal Protection に関し、CDC の David Bell と WHO がまとめた総説をもとに、他の文献等を参考しレビューを行った。

1-1. 公共の場でのマスクの使用

公共の場でのマスクの使用がインフルエンザ感染を防ぐというはっきりとした Evidence はない。しかし実際に過去のパンデミックにおいてはマスクの使用が広く推奨されてきたという事実がある。SARS 流行時に公共の場でのマスクの使用が SARS 感染阻止に効果があったことが香港¹、北京²で示されている。しかし、Retrospective questionnaire survey であることや、マスクをしていた人は他の対策を行っていた可能性もあり、マスクの効果について、はっきりとした結論は得られていない。

N95 マスクやサージカルマスクがあるが、どのマスクを使用すべきか考えた場合、インフルエンザウイルスの感染経路が問題、すなわちインフル

エンザウイルスが空気感染をするのかどうか問題になる。空気感染の根拠によく引用されるのは、アラスカの空港で起きた飛行機内でのインフルエンザの流行である³。しかしこの流行においても他の感染経路（トイレの使用による直接感染など）も考えられ、空気感染が起こったという明らかな Evidence ではない。現在も空気感染があると主張する立場⁴と、空気感染はないかあっても非常に稀だとする意見⁵がある。各国のパンデミックガイドラインの中でも公共の場でのマスクの使用に対する立場は大きく分かれ、最近出されたカナダのガイドラインの中でもマスクの使用は結論の出していない項目として特記されている。

1-2. 手洗い

手洗いについても、インフルエンザウイルスを対象としてその効果を正しく検証した論文はこれまでない。Evidence として存在するのは手洗いによって急性呼吸器感染⁶や肺炎⁷の Incidence を有意に減らすというものであり、インフルエンザに対する効果を評価したものではない。そもそもインフルエンザウイルスは手指では5分程度しか生存しないというデータもあり⁸、日常生活の中で

の手洗いがどの程度効果があるかについては疑問の余地もある。上記の急性呼吸器感染等に対する評価は、かなりの頻度で手指での感染拡大が起ることが証明されているライノウイルスなどの感染を含んでおり、インフルエンザに対する効果はわからないということになる。

1-3. うがい

ほとんどの国で、うがいは季節性インフルエンザとパンデミックインフルエンザのいずれに対しても推奨されておらず、うがいに対する研究は日本以外ではほとんど行われていない。うがいによって急性呼吸器感染の Incidence が下がったとするデータはあるが⁹、ウイルス学的な検索などは

行っていないためにインフルエンザに対する効果は不明である。これに関連する研究としてはお茶の中に含まれるカテキンによるうがいがインフルエンザに対し有効だとするデータがある¹⁰。しかし、この研究もカテキンの評価が中心であり、うがいそのものの効果を評価しているわけではない。

1-4. 結論

通常行っているインフルエンザ対策において基本的なエビデンスが少ないことより、これらを裏付けるような検証が今後必要であると考えられる。

研究 2. 早期封じ込めと Mitigation Strategy

インフルエンザ対策として、「封じ込め」と「Mitigating strategy」が挙げられる。前者がウイルスを完全に根絶やしにすることを目的とするのに対し、後者は被害を最小限に抑えることを目的とする。この異なった二つのコンセプトについてレビューを行い、実際日本で行う際の問題点を整理した。

2-1 「早期封じ込め」

2-1-1. 「早期封じ込め」感染モデル

早期封じ込めを考える上での基本となる論文が、2005年に発表された¹¹¹²。これらは、2005年の時点での鳥インフルエンザ H5N1 の状況を前提（人での感染が東南アジアに限局）として、早期封じ込めの可能性について検討している。

早期封じ込めが成功するためには、いくつかの条件が必要であるとしている。まず、人口密度が低く、他の地域との交流の少ない農村地帯で最初のヒト-ヒト感染が起こることである。人口密度が高い東南アジア大きな都市で起これば、成功の

可能性は低い。次に、ヒト-ヒト感染が迅速に検出され、封じ込めのための対策が速やかにとられる事としている。具体的には、最初の例が出現してから 2-3 週間以内に開始する必要がある。

結果は、図 1 に示したとおりである。様々な条件があるが、複数の対策を同時に行うことにより、効果が期待できるとしている。しかし、これらのモデルにも問題点がある。まず、 R_0 (Reproductive number: 一人の患者が平均して何人の人に感染させるかという感染性を示す指標) が中程度の状況を想定 ($R_0=1.6-1.8$) している。実際にヒト-ヒト感染を起こすようになったウイルスの感染性は、現時点でわからない。過去のパンデミックや通常のインフルエンザに対する R_0 の推計でも、1.5 程度とするものから 2-3 であることより、 R_0 が 2-3 の場合は早期封じ込めが成功しない確率が高い。また、1ヶ所のみ、もしくはその周囲の数ヶ所でのみヒト-ヒト感染を起こすウイルスが出現することを想定している。しかし、実際には別々の場所で同時に出現する場合もあることが指摘されており、この場合も早期封じ込めは成功しない可能性が高い。

表1 「早期封じ込め」感染モデルの比較

	Ferguson NM, et al. <i>Nature</i> 2005; 437 :209-14	Longini IM, et al. <i>Science</i> 2005; 309 :1083-7.
内容	<p>前提条件 : $R_0=1.8$、T_g (Generation time) =2.6 days、タイ農村部で出現、症例の早期検出が可能、90%以上の対象住民が服薬</p> <p>予防投薬のシナリオ</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Socially targeting</i>—発症者の家庭・学校・職場の人達への予防投薬 • <i>Geographic targeting</i>—ある地域の住民全員への予防投薬 <p>想定されている Social distance 対策</p> <ul style="list-style-type: none"> • 学校・職場の閉鎖 • 対象地域への人の出入りの制限 	<p>前提条件:タイ農村部で出現 (50 万人が 5625m²) に居住 (人口密度 89/k m²)</p> <p>対策</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Targeted antiviral prophylaxis (TAP)</i>:発症者の家族・隣人・遊び友達・学校・職場 • <i>GTAP (Geographically TAP)</i>:対象地域の住民すべて • <i>Household quarantine</i>:発症者と接触者に対し家庭及び近所以外の移動を制限 • ワクチン:有効率の低いワクチン (有効率 30%程度) を想定
結論	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Socially targeting</i> では成功の確率が低い • <i>Geographic targeting + Social distance</i> により高い成功の確率 • 300 万人分の Oseltamivir が必要 	<ul style="list-style-type: none"> • R_0 が 1.6 まででは単独の 80%TAP・90%GTAP とともに有効 • 80%TAP + ワクチンでは $R_0=2.1$ まで有効 • 80%TAP + ワクチン + Household quarantine では $R_0=2.4$ まで有効 • 最初の症例が発生してから 21 日以内に始めることが必要 • 有効率の低いワクチンでも成功率を上げることが出来る

2-1-2. 各国の対応

各国のパンデミック対策の中での早期封じ込めに対する基本的な考え方も、様々である。

イギリスの “UK Influenza Pandemic Contingency Plan-October 2005” では、いったんイギリス国内で患者が発生すれば封じ込めは不可能だとしている。また、単に流行を遅らせるだけの効果であり、薬の備蓄がなくなってしまうとし、イギリス国内での封じ込めは特殊な条件化でのみ考慮されるとしている。アメリカの “HSS Influenza Pandemic Plan-November 2005” では、特殊な条件化でのみ可能としてうえで、6 百万人分の Oseltamivir は封じ込め用と

して確保している。カナダの “Canadian Pandemic Influenza Plan for the Health Sector, Dec 2006” では、カナダ国内の封じ込めや Mitigation のための戦略は現在作成中とし、2006 年 12 時点では抗ウイルス薬を封じ込めや伝播阻止のために使うことは推奨していない。オーストラリアの “The Australian Health Management Plan for Pandemic Influenza, May 2006” では、早期封じ込めを基本戦略とし、ワクチン開発のための時間稼ぎをするために早期封じ込めのための対策を最大限行うとしている。ニュージーランドの “New Zealand Pandemic Action Plan, Sep 2006” でも、封じ込めをできるだけ行うとしてい

る。封じ込めにはさまざまな問題・不確定要素があるが、ニュージーランドの地理的条件を考えると封じ込めができると考えている。

2-1-3. 日本国内での対応

日本で早期封じ込めが成功する条件としては、まず日本が最初のヒト-ヒト感染の発生国となることであるが、現時点のトリインフルエンザの発生状況からは考えにくい。一方、他国から最初の感染者が流入した場合、それ以降の感染者の流入をほぼ完全に抑え、かつ感染性が想定よりもかなり低い条件の場合のみ、早期封じ込めは可能である。

オーストラリアやニュージーランドが考えているような、国境封鎖に近いような対策を日本でとることが難しいとなると、日本で早期封じ込めを目的とした対策をとることは不可能となる。現在の日本での抗ウイルス薬の備蓄は治療への使用が主目的であるため、これを封じ込めに転用した場合国民の理解が得られるか、これまでの政府・都道府県の説明と矛盾しないかといった問題が考えられる。また封じ込めには国の備蓄を使うのか、都道府県の備蓄を使うのかということも決めておく必要がある。さらに備蓄をどの程度まで封じ込めに使うのかということも問題となる。症例数が増えても封じ込めを目的とした対策を行うとなると、現在保有している備蓄を全部使っても足りなくなる可能性もあり、治療用には残らないことになる。

人の移動の制限をとともう封じ込め対策を行った場合生じる問題として次のようなことが挙げられる。1) 経済的損失をだれが補償するのか、2) 現行の法律では不可能であるため超法規的措置として行うのか、もしくはこれから法改正をするのか、3) 人権問題、4) 移動が制限された人たちが感染し死亡するような事態になった場合の補償や法的な責任、5) 封じ込めをしてもかなりの確率で失敗する可能性があり、それを国民にどう説明するのか、6) 数千から数万人の人員が必要となるが、人員をどう確保するのか、7) 移動制限を守ら

ない人に対してどういう法的な措置をとるのかなどが考えられる。

2-2. Mitigating Strategy

封じ込めがウイルスを完全に根絶やしにすることを目的とするのに対し、Mitigating strategyは被害を最小限に抑えることを目的とする。その具体的な目的は次のように分類できる。流行のピークを遅らせることによりワクチン生産などのための“時間稼ぎ”が可能となる(図1-1)。流行の規模を小さくすることにより、全体の感染者数を抑えるとともにピーク時の医療・社会機能等の破綻を防ぐ(図1-2)。また、なるべくならだらかなピークとなるようにすることにより、全体の感染者数は同じでもピークが小さくなる分、医療・社会機能等の破綻を防げる(図1-3)。このMitigation Strategyをイギリスおよびアメリカで行った際のシミュレーションが報告されており^{13,14}、これらをもとに日本におけるMitigation Strategyについて考察した。

2-2-1 Mitigating Strategy の具体的対策

Mitigating Strategyの具体的な対策として、「国境での水際作戦」と Targeted Antiviral Prophylaxis (TAP)がある。国境での“水際作戦”により、ウイルス流入の時期を遅らせることにより流行のピークを遅らせることが可能となるが、国境封鎖に近い対策をしないと実際の効果はほとんどないことが疫学モデルでは示されている¹³。一方の、Targeted Antiviral Prophylaxis (TAP)は、感染が確認された患者の濃厚接触者あるいは接触する機会があったと考えられる人に対して抗ウイルス薬の予防投与を行う方法である。この場合の接触者の範囲の考え方には、大きく分けて2つある。一つ目は、接触者調査を行い、見つかった接触者に対し抗ウイルス薬の予防投与を行う考えた方である。二つ目は、感染が拡大した際には各々の感染例に対して接触者調査をすることは実際的ではないため、接触した可能

性が高いと考えられる集団（家族・近隣住民・同じ学校や職場の人全員）に対して抗ウイルス薬の予防投与を行う方法である。他の対策として、感染者の家族等濃厚接触者もしくは濃厚接触の可能性の高い人は家庭に留まる Home quarantine（もしくは Household quarantine）や、学校・職場の閉鎖、ワクチン接種などが考えられる。Mitigating Strategy におけるワクチンは、Pre-pandemic vaccine と Post-pandemic vaccine に分けて考える。前者は、パンデミックを起こす可能性の高いウイルス亜型（現時点では H5N1 がこれにあたる）に対するワクチンをパンデミックが始まる前に作成しておいたものである。実際のパンデミック株の抗原性がワクチン株と異なる可能性があり、その場合は有効性が低くなる。後者は、パンデミックが始まってから生産されるワクチンである。パンデミック株が急速に抗原性を変化させない限り、ワクチン株の抗原性はパンデミック株と一致する。しかし、最大の欠点として、パンデミックが始まってからワクチンの生産をするため、数ヶ月のタイムラグが生じてしまうことである。

2-2-2. Mitigating Strategy の中で考えられている対策の有効性

基本的には単一の対策では十分な有効性が期待できず、いくつかの対策を組み合わせる必要がある。特に抗ウイルス薬もしくはワクチンは、有効性を確保するために必須である。しかし相当量の抗ウイルス薬を予防投与に使う必要が出てくる。現行の日本の備蓄から予防投与に相当量を回すことが可能かどうかの問題はある。これまでの専門家会議の議論のなかでも Early containment（早期封じ込め）と Mitigating Strategy についての区別がはっきりしていない。日本でも TAP などの Mitigating Strategy は当然行われるべきだと考えるが、早期封じ込めを行うべきかどうかということに関してはさらに議論が必要だと考える。

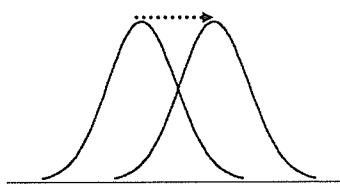


図 1-1

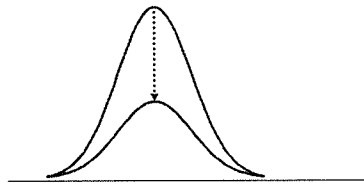


図 1-2

図 Mitigation Strategy

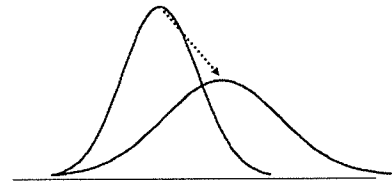


図 1-3

表2 「Mitigation strategy」 感染モデルの比較

論文	Ferguson NM, et al <i>Nature</i> 2006; 442 :448-52.	Germann TC, et al <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 2006; 103 :5935-40
内容	<p>アメリカとイギリスを対象として種々の対策の有効性を検討</p> <p>前提条件</p> <ul style="list-style-type: none"> • $R_0=1.4$ (‘moderate’ transmission) • $R_0=2.0$ (‘high’ transmission) • 50%の感染者が発症 <p>検討された対策</p> <ul style="list-style-type: none"> • TAP (Socially targeted antiviral prophylaxis) : 発症者とその濃厚接触者が抗ウイルス薬の投与を受ける • ワクチン: 投与対象はランダムに選ばれた人、もしくは子供に優先投与 • Household quarantine : 感染者の家族に家に留まらせる • 学校・職場閉鎖 	<p>アメリカ全体 (人口 2 億 8100 万人) を対象として種々の対策の効果を検討</p> <p>前提条件</p> <ul style="list-style-type: none"> • $R_0=1.6-2.4$ • 国境で流入を抑えることは不可能であるという前提 <p>検討された対策</p> <ul style="list-style-type: none"> • TAP (Socially targeted antiviral prophylaxis) : • ワクチン: • 学校閉鎖: Preschools と Play groups を含む • Social distancing :
結論	<ul style="list-style-type: none"> • Border control による Peak の 2-3 週間遅延させるためには Border control の有効性が 99%以上であることが必要 • 感染者の流入がある限り封じ込めは不可能。抗ウイルス薬の必要量は人口の 5 倍 (それでも完全な封じ込めはできない)。 • 感染者への抗ウイルス薬の投与が効果的であるためには発症後 1 日以内の投与が必要。発症者の隔離も同様。2 日目以降では効果が減じる。 • 家族への抗ウイルス薬の予防投与は有効 (Cumulative attack rate を 1/3、Peak attack rate を 1/2 減らす。しかし人口の 50% の Stockpile が必要)。 • Household quarantine はコンプライアンスが高い場合にのみ有効。 • 学校閉鎖は全体の罹患率の減少に 	<p>それぞれの対策を単独で行った場合</p> <ul style="list-style-type: none"> • TAP : $R_0=1.7$ までは有効、$R_0=1.8$ 以上では大量の抗ウイルス薬が必要となり現実的ではない。R_0 が低ければ封じ込めの可能性も。 • ワクチン : $R_0=1.9$ までは有効、特に子供に優先的に投与した場合 • 学校閉鎖 : $R_0=1.6$ でのみ有効 • Social distancing : いずれも単独では有効ではない • $R_0>1.9$ ではいずれの対策も単独では有効ではない <p>以下の組み合わせで行った場合、高い感染性を持つウイルス ($R_0=2.4$) にも有効</p> <ul style="list-style-type: none"> • TAP+学校閉鎖+Social Distancing • ワクチン+Social Distancing+Travel Restriction (長距離の旅行を通常のレベルの 10% まで減らす)+学校閉鎖 • TAP+ ワ ク チ ン + Social Distancing+Travel Restriction+学校閉鎖

	<p>はあまり効果なし。しかし、Peak attack rate を下げる効果あり (40%まで)。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 学校・職場閉鎖+学校・職場での予防投薬は大きな効果があるが、人口の 70-100%の抗ウイルス薬の備蓄が必要。 • ワクチンは 2 ヶ月以内に投与が開始できれば効果あり。 • Pre-pandemic ワクチンの備蓄 (人口の 20%分)はワクチンの有効性が低くても十分な効果。 • ウイルスの伝播を抑えるためには高齢者よりも子供にワクチンを接種したほうが有効。 	<ul style="list-style-type: none"> • ワクチン (子供優先) + Social Distancing+Travel Restriction + 学校閉鎖
--	---	--

研究 3. インフルエンザ感染経路に関するウイルス学的検討

インフルエンザの感染経路等に関する具体的な Evidence を得るために、2006-07 インフルエンザシーズンに行うウイルス学的研究の準備を行ってきた。

3-1. インフルエンザなどの呼吸器ウイルス感染症集団発生時の疫学的・ウイルス学的検討

研究目的

インフルエンザは高齢者を中心に毎年多くの超過死亡の原因となっており、肺炎による死亡者数は約 95,000 人に上り特に高齢者における対策の充実が望まれており、また最近では新型インフルエンザによるパンデミック (大流行) に対する警戒が強まっているなど、特にウイルス性呼吸器感染症への注目が増している。日本においてインフルエンザを主とした呼吸器感染症の流行は冬期を中心に見られており、全国 4700 箇所インフルエンザ定点医療機関による定点サーベイランスを主としてインフルエンザシーズンには

学級等閉鎖情報、流行迅速把握情報など種々のサーベイランスがインフルエンザ (様疾患) に対して行われている¹⁵。しかしこれらの多くは、早期探知や動向を把握する目的で行われており、異常集積が見られた場合の検討などを目的としていない。近年は、実地疫学の重要性が評価されており、世界保健機関における IHR (世界保健規則) の改正なども受けて、疫学調査の重要性が評価されている¹⁶。しかしながらインフルエンザを含むウイルス性の急性呼吸器感染症は疫学的あるいはウイルス学的に十分検討されたとは言えず、インフルエンザ迅速診断キットの偽陰性例やウイルス排泄量と感染性の問題¹⁷や SARS の時に見られたような super spreader¹⁸など従来の感染症モデルでは把握できない流行伝播が起こる可能性も考えられ、流行の拡大の詳細については不明な点が多い。また、異常集積における疫学的検討により、医療行為以外に公衆衛生学的介入を行なう余地を広げ、結果として集団発生の拡大を防ぐことが出来ると考えられる¹⁹。以上のような観点から、呼吸器感染症の異常クラスターに対して共通し

た調査書（添付資料）を用いた疫学調査を行い、詳細をまとめるとともに適切な介入法を検討するパイロットプロジェクトを行うこととする。

研究方法

平成 18 年 12 月から平成 19 年 5 月の間に、東北地方、特に宮城県における病院や老人福祉施設などにおいて、医師が急性呼吸器症状のクラスターであると判断したものを対象として、調査書を使用した疫学調査及び生体試料を利用したウイルス学的検討を行う。適切な仮説が設定できた場合には、解析疫学を行うこととする。臨床検体として咽頭ぬぐい液および血清を採取し、前者からウイルス分離、および後者を用いたウイルス抗体価測定を赤血球凝集阻止反応試験にて行う。

3-2. 小児のインフルエンザにおける呼吸器および消化器からのインフルエンザウイルスの排泄についての検討

研究の目的

トリインフルエンザウイルス（H5N1）は、2003 年からの約 4 年間で 258 のヒトへの感染例が WHO へ報告されており、そのうち 154 症例が死亡している²⁰。注目すべき点として、トリインフルエンザウイルスが罹患者の気道分泌物のみならず、便や血中からも分離・検出されたとする報告である²¹。これは、ヒトが免疫を持っていない新型インフルエンザに罹患した際、患者の気道内分泌物以外に便からも感染しうることを示唆しており、ウイルス学、感染予防・防御および公衆衛生の観点においても非常に重要な発見である。一方 Wootton 等は、通常のヒトインフルエンザに罹患した小児の便中からインフルエンザウイルスを PCR にて検出している²²。小児の免疫能が十分に発達しておらず、ワクチンの効果も低く、インフルエンザウイルスへの免疫が未熟である点²³は、ヒトが新型インフルエンザウイルスに対して免疫がない点と類似しており、小児における便中へのウイルスの排泄は新型インフルエンザ感染のモ

デルに近いと考えられる。そこで我々は、インフルエンザに対して免疫を十分持っていないと予想される 2 歳以下の小児インフルエンザ患者の気道分泌物および便中から既存のインフルエンザウイルスを検出し、1) 検体中のウイルス量の経時的な変化、2) ウイルス抗原性とウイルスの排泄の関連について、3) 臨床像とウイルス排泄量などについて観察し、ヒトが新型インフルエンザウイルスに感染した際のウイルス排泄方法について類推できると考えている。

研究方法

2006-07 および 2007-08 のインフルエンザウイルス流行時期に、対象医療機関の小児科外来および入院患者のうち、インフルエンザウイルス迅速診断キットが陽性であった 2 歳以下の小児を対象とする。保護者からの同意を得られた対象患者より、咽頭拭い液および便を採取する。外来患者は外来受診時の 1 回、入院患者は入院時、入院中、退院時の 3 回検体を採取する。採取した検体より、東北大学微生物学分野にてにおいてインフルエンザウイルスの検出および解析を行う。分離したインフルエンザウイルスについて、抗原性解析（赤血球凝集阻止試験）、ウイルス定量（real time PCR および plaque 法）、遺伝子型の解析などを行う。対象患者より、性別、月齢、発育歴、既往歴、インフルエンザワクチン接種歴、インフルエンザ発症日、医療機関受診日、検体採取日、臨床像、インフルエンザ迅速診断キット結果、血液検査結果、エックス線検査などの情報を収集する。

研究発表

1. 論文発表

【英文】

- Oshitani H. Potential benefits and limitations of various strategies to mitigate the impact of an influenza pandemic. *J Infect Chemother.* 12: 167-171. 2006
- Dinh PN, Long HT, Tien NTK, Hien NT,

Mai LTQ, Phong LH, et al. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerg Infect Dis* 2006 Dec. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no12/06-0829.htm>

【和文】

- 押谷仁 新型インフルエンザ 医学のあゆみ 218 巻 2 号 Page174-175(2006.07)
- 押谷仁 グローバル化する 21 世紀の新興感染症 東北のコロニー 33 号 Page41-47 (2006.09)
- 押谷仁 国際保健の観点からみた感染制御 WHO におけるあらたな取り組みと将来展望 医学のあゆみ 218 巻 13 号 Page1063-1066 (2006.09)
- 押谷仁 鳥インフルエンザ A(H5N1)の現状と日本の新型インフルエンザ対策の課題 公衆衛生 70 巻 9 号 Page696-700 (2006.09)
- 押谷仁 最新の WHO の新型インフルエンザ対策 インフルエンザ 7 巻 1 号 Page47-51(2006.01)
- 押谷仁 インフルエンザの流行の歴史と現在の世界の状況 医薬ジャーナル 41 巻 12 号 Page2875-2880(2005.12)
- 押谷仁 鳥インフルエンザと新型インフルエンザ Medical Technology 35 巻 1 号 (2007.01)
- 押谷仁 グローバルな新型インフルエンザ対策 感染症 36 巻 6 号 (2006.11)
- 押谷仁 新型インフルエンザのパンデミック 分子呼吸器病 11 巻 1 号 (2007.01)
- 押谷仁 新型インフルエンザに対していかに備えるか カレントセラピー 24 巻 12 号(2006.12)
- 押谷仁 新型インフルエンザをめぐる世界の状況 臨床と研究 83 巻 12 号 (2006.12)
- 押谷仁 インフルエンザパンデミック 小児感染症学(印刷中)
- 2. 学会発表
- 押谷仁 鳥インフルエンザの現状と国際的対応 東北国際保健研究会学術集会 2006. 4.23(福島)
- H Oshitani Overview of Major Issues for Assessment of Disease Burden of Viral Diseases in Asia. Vaccines For Viral Infections In Developing Countries (Yokohama) 2006.07.27-28
- 押谷仁 鳥インフルエンザ A(H5N1)はパンデミックを起こすのか? ウイルス学的に見た新型インフルエンザ出現の可能性 第 7 回感染病態シンポジウム(仙台) 2006.06.13
- 押谷仁 新型肺炎 (SARS) の謎: どこから現れ、どのように広がり、そしてどこへ消えてしまったのか? 仙台医療センター地域医療研修センター講演(仙台) 2006.06.14
- 押谷仁 新型インフルエンザ対策の現状と問題点 第 5 回総合診療フォーラム(仙台) 2006.06.20
- 押谷仁 新興ウイルス感染症の脅威 みちのくウイルス塾(仙台) 2006.07.15.
- 押谷仁 国境を越えるウイルス感染症 鳥インフルエンザと地球規模大感染の危険性 東北大学 100 周年セミナー(東京) 2006.08.02
- 押谷仁 新型インフルエンザ対策の現状と問題点 第 4 回長崎感染症予防研究会 (長崎) 2006.09.15.
- 押谷仁 国際化と新興感染症 輸血学会支部例会(仙台) 2006.09.16
- 押谷仁 鳥インフルエンザの現状とパンデミック対策の課題 インフルエンザワクチン学術講演会(沖縄) 2006.10.12.
- 押谷仁 鳥インフルエンザ・SARS などの新興ウイルス感染症の脅威と課題 日本臨床検査学会(弘前) 2006.11.10
- 押谷仁 種のバリアーと国境を越える感染症

- の脅威 馬感染症研究会(栃木) 2006.10.20
- 押谷仁 鳥インフルエンザの現状と新型インフルエンザ対策の課題 上越 IC フォーラム(上越) 2006.11.13.
 - 押谷仁 鳥インフルエンザによる新型インフルエンザ(パンデミック)のリスクと医療従事者及び産業医のとるべき対応 仙台市医師会講演会(仙台) 2006.11.15.
 - H Oshitani. Possibility of Early Containment of Potential Influenza Pandemic. 11th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (Singapore) 2006.11.16-18.
 - 押谷仁 新型インフルエンザに対するエビデンス:何がわかっていて何がわかっていないのか 第9回九州感染症・化療フォーラム(福岡) 2007.01.13.
 - 押谷仁 新型インフルエンザ対策の現状と問題点 奈良県新興感染症研究会(奈良) 2007.01.17.
 - 押谷仁 小児科の視点から見た新型インフルエンザの対策の課題 東北小児感染症懇話会(仙台) 2007.01.20.
 - 押谷仁 グローバル化する新興感染症に対する危機管理体制 岩手県立病院医学会学術総会(盛岡) 2007.02.03.
 - 押谷仁 新型インフルエンザ対策の現状と今後の課題 臨床微生物学会(長崎) 2007.02.17-18.
 - 押谷仁 グローバル化する新興感染症と日本の課題 新潟県臨床検査技師会(新潟) 2007.03.03.

-
- ¹ Lau JT, et al. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:587-92.
 - ² Wu J, et al. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:210-6.
 - ³ Moser MR, et al. *Am J Epidemiol.* 1979;110:1-6.
 - ⁴ Tellier R, *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1657-62.
 - ⁵ Lemieux C, et al. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:173-4.
 - ⁶ Ryan MA, et al. *Am J Prev Med.* 2001 Aug;21(2):79-83.
 - ⁷ Luby SP, et al. *Lancet.* 2005;366:225-33
 - ⁸ Bean B, et al. *J Infect Dis* 1982; 146:47-51.
 - ⁹ Satomura K, et al.
 - ¹⁰ Yamada H, et al. *J Altern Complement Med.* 2006 Sep;12(7):669-72
 - ¹¹ Ferguson NM, et al. *Nature* 2005;437:209-14
 - ¹² Longini IM, et al. *Science* 2005;309:1083-7.
 - ¹³ Ferguson NM, et al *Nature* 2006;442:448-52.
 - ¹⁴ Germann TC, et al *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5935-40
 - ¹⁵ 安井良則、ウイルス 2006 ; 56 : 67-76
 - ¹⁶ 岡部信彦. 感染症誌 2006 ; 80 : 59-63
 - ¹⁷ 小杉依子、感染症誌 2004 ; 78 : 995-999
 - ¹⁸ Wang ShX, Li YM et al. *Epidemiol Infect*2006;134(4):786-91
 - ¹⁹ Ran D. B et al.. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:579-583
 - ²⁰ WHO・Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR),
 - ²¹ de Jong MD et al. *NatMed.* 2006 ; 12 : 1203. 1207
 - ²² Wootton S et al. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 ; 25 : 1194-1196
 - ²³ Takuji Kumagai, et al. *Vaccine.* 2004; 22: 3404-3410

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

厚生労働科学研究費補助金（振興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞でのインフルエンザウイルス感染様式の検討

分担研究者 滝澤剛則（富山県衛生研究所 部長）
協力研究者 堀元栄詞（富山県衛生研究所 主任研究員）
協力研究者 岩井雅恵（富山県衛生研究所 研究員）
協力研究者 小原真弓（富山県衛生研究所 研究員）
協力研究者 長谷川澄代（富山県衛生研究所 再任用主任）
協力研究者 倉田 毅（富山県衛生研究所 所長）

インフルエンザウイルスは主に MDCK 細胞を用いて分離されているが、変異ウイルスや新型ウイルスを効率よく分離するためには、宿主細胞を複数揃えておく必要がある。一方、鳥インフルエンザウイルスは腸管でも増殖し、人に感染した事例でも下痢などの消化器症状が報告されている。そこで、大腸がん由来 Caco-2 細胞のインフルエンザウイルスの感染様式を検討した。その結果、Caco-2 細胞では、培養上清に回収されるウイルス力価、および感染細胞数とも MDCK 細胞に比し、10 分の 1 程度に少なかった。しかしながら、ウイルスの吸着は両者で大きな差は無く、また、NS1 や HA 合成能は MDCK 細胞に比して Caco-2 細胞が少ないということは無かった。以上から、Caco-2 細胞では、ウイルスの粒子形成、あるいは再感染のプロセスが非常に遅いことが予想された。Caco-2 細胞は腸管系細胞に分化することなどが報告されているため、今後は十分に分化させた状態での感染様式や、Caco-2 細胞でウイルスの継代を繰り返すと、どのような変異が現れるのかを検討する。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは主に MDCK 細胞を用いて分離、解析されているが、エンテロウイルスなどの分離に汎用されるヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞も用いられることがある。変異ウイルスや新型ウイルスを効率よく分離するためには、宿主細胞を複数揃えておく必要がある。一方、鳥インフルエンザウイルスは腸管でも増殖し、人に感染した事例でも下痢などの消化器症状が報告されている。そこで、インフルエンザウイルスの腸管で

の感染様式を推定するために、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞をモデルとして用いて、インフルエンザウイルスの感染様式を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養、およびウイルス

Caco-2 細胞は 37℃、5%炭酸ガス存在下に、GIT 培地で培養した。MDCK 細胞は、10%FCS 添加 DMEM 培地を用いた。インフルエンザウイルスは昨年度の分離株 (H1N1) を用いた。細胞を無血清培地で洗浄後、一定量のウイルス液を入れ

34℃で30分、あるいは室温に一定時間孵置した。細胞を無血清培地で2回洗浄し、2%BSA添加EMEM培地を加えて、アセチルトリプシン存在下、あるいは非存在下に34℃で培養した。定時ごとに培養上清を回収した。

2) 免疫染色

35mm培養皿に入れたカバーガラス上に培養した細胞に、一定時間ウイルスを感染させた後、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)/0.1%Triton-Xで室温にて20分間固定した。固定した細胞を室温で10%goat血清/TBS中に30分間、ヒト抗ウイルス血清、次いでFITC標識抗ヒトIgG抗体中に各1時間ずつ孵置することにより染色した。あるいは、10%goat血清/TBS処理後に、抗NS1ウサギ抗血清、次いでFITC標識抗ウサギIgG抗体処理により、上記と同様に染色した。染色細胞は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3) ウェスタンブロット

一定時間感染させた細胞をPBSにて2回洗浄後、100 μ lのSDS-PAGE用サンプルバッファーにより溶解して回収した。溶解液は100℃、3分間処理した後、10%SDS-PAGEにより分離した。SDS-PAGE後、定法に従って試料をゲルからニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は、5%スキムミルク/TTBS、ヒト抗ウイルス血清/TTBS、または抗NS1ウサギ抗血清/TTBS、次いでHRP標識抗ヒトIgG抗体/TTBS、またはHRP標識抗ウサギIgG抗体/TTBS中で各1時間ずつ室温に孵置した後、TMBキット(VECTOR社)により染色した。

C. 研究結果

1) 培養上清に回収されるウイルス力価

MDCK細胞、およびCaco-2細胞に同量のウイルスを感染させてトリプシン存在下に培養し、定時ごとに培養上清を回収した。また、感染細胞を固定して、蛍光抗体により感染細胞数を測定した。一方、回収した上清はMDCK細胞に感染させて、トリプシン非存在下に8時間培養し、感染細胞を蛍光抗体により染色して、上清中の感染力価を測定した。その結果、Caco-2細胞では、感染24時間後の培養上清に回収されるウイルス力価は、MDCK細胞に比し約10分の1程度だった(図1)。

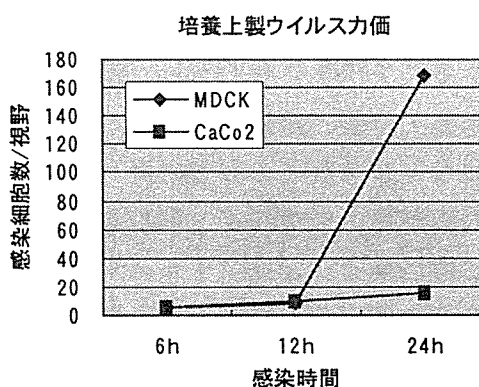
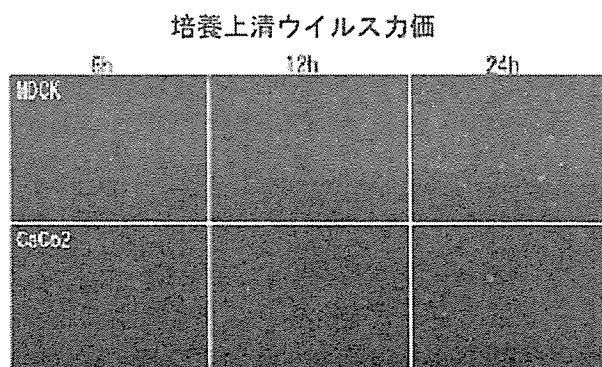


図1 培養上清のウイルス力価

ウイルス感染したMDCK細胞およびCaco-2細胞の培養上清中のウイルス力価を示した。蛍光染色された細胞を各3視野ずつ数えて、平均値をグラフにした。

また、感染細胞数も MDCK 細胞に比し、Caco-2 細胞では感染力価と同程度に少なかった (図 2)。

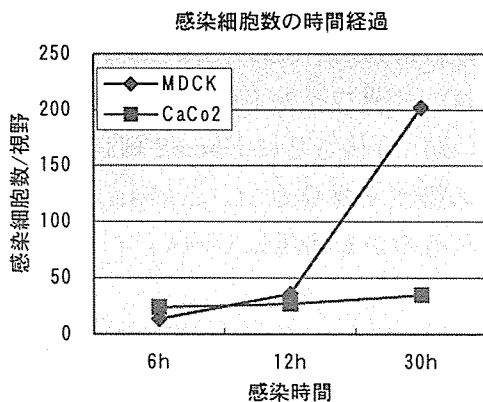
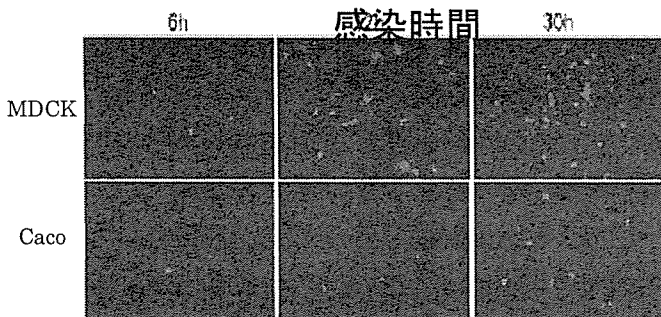


図 2 感染細胞数の時間変化

MDCK 細胞および Caco-2 細胞の感染細胞数の経時変化を示した。蛍光染色された細胞を各 3 視野ずつ数えて、平均値をグラフにした。

Caco-2 細胞へのウイルスの吸着効率が悪い可能性が考えられたため、同量のウイルスを MDCK 細胞、あるいは Caco-2 細胞に 10~60 分室温で吸着させた後、トリプシン非存在下に 6 時間培養して感染細胞数を測定した。その結果、Caco-2 細胞の方が MDCK 細胞に比して全般的に低値ではあったものの、図 1, 2 の値を説明するほど低くは無かった (図 3)。一方、細胞を感染 3~24 時間後に集めて、ウ

イルスタンパク質合成をウェスタンブロットにより観察したところ、NS1 に関しては、Caco-2 細胞と MDCK 細胞とも同程度の発現量だった (図 4 A)。他方、HA は Caco-2 細胞では明瞭なバンドが認められたのに対して、MDCK 細胞では余り明瞭ではなかった (図 4 B)。これは、両細胞で糖鎖の付加状態が異なるためと予想された。しかしながら、Caco-2 細胞の方が MDCK 細胞よりウイルスタンパク質の合成能が著しく劣るということは無いが予想された。

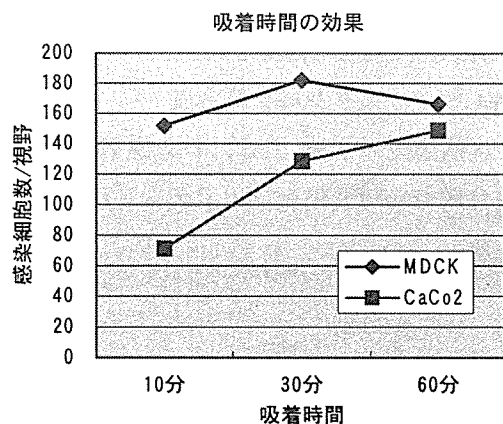
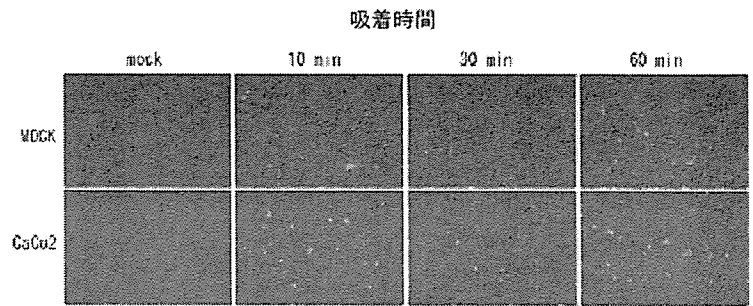


図 3 吸着時間の効果

ウイルスの吸着時間の違いによる MDCK 細胞および Caco-2 細胞の感染細胞数を示した。蛍光染色された細胞を各 3 視野ずつ数えて、平均値をグラフにした。

D. 考察

Caco-2 細胞では、インフルエンザウイ