

## Antimicrobial sensitivity of *H.influenzae* isolated from AOM children

Classification by MIC of ampicillin

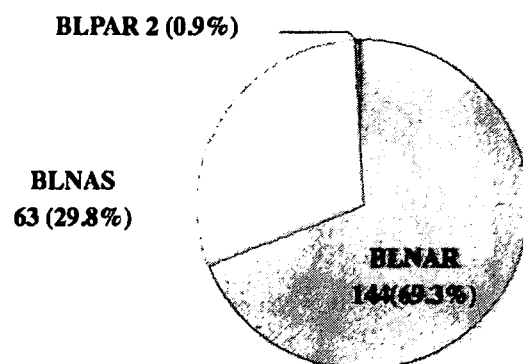
sensitive  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  resistant  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$

Classification by  $\beta$ -lactamase production

$\beta$ -lactamase non-producing ampicillin resistant BLNAR

$\beta$ -lactamase non-producing ampicillin sensitive BLNAS

$\beta$ -lactamase producing ampicillin resistant BLPAR



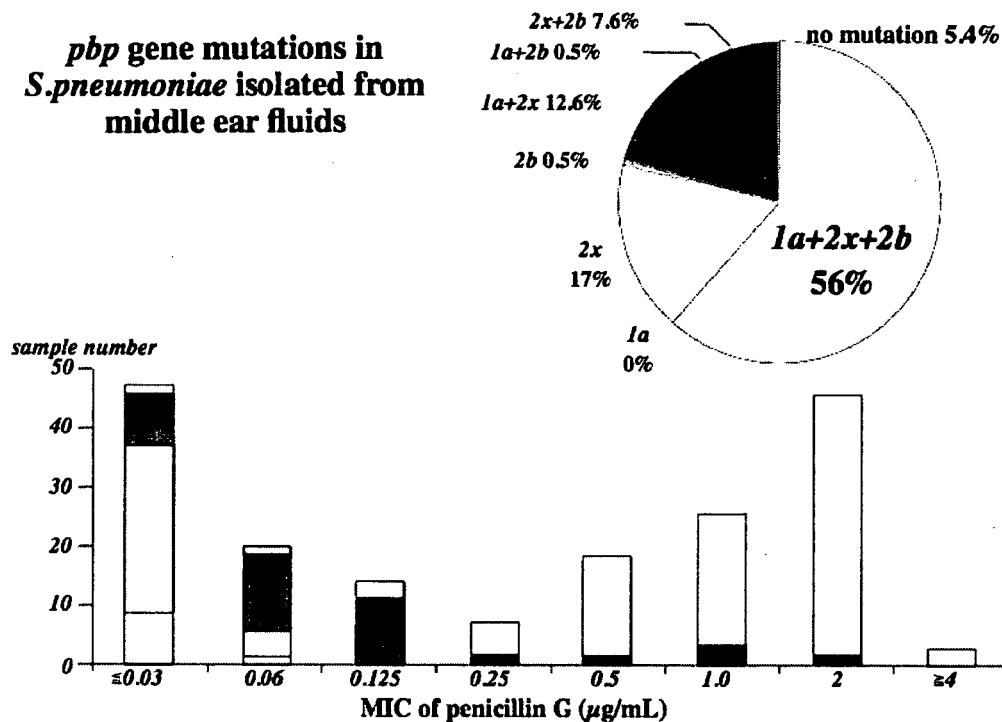
Middle ear isolates from AOM patients (n=209) (ATOMS surveillance 2006-2007)

図 2

### 2) 遺伝子検索 (図 3, 4)

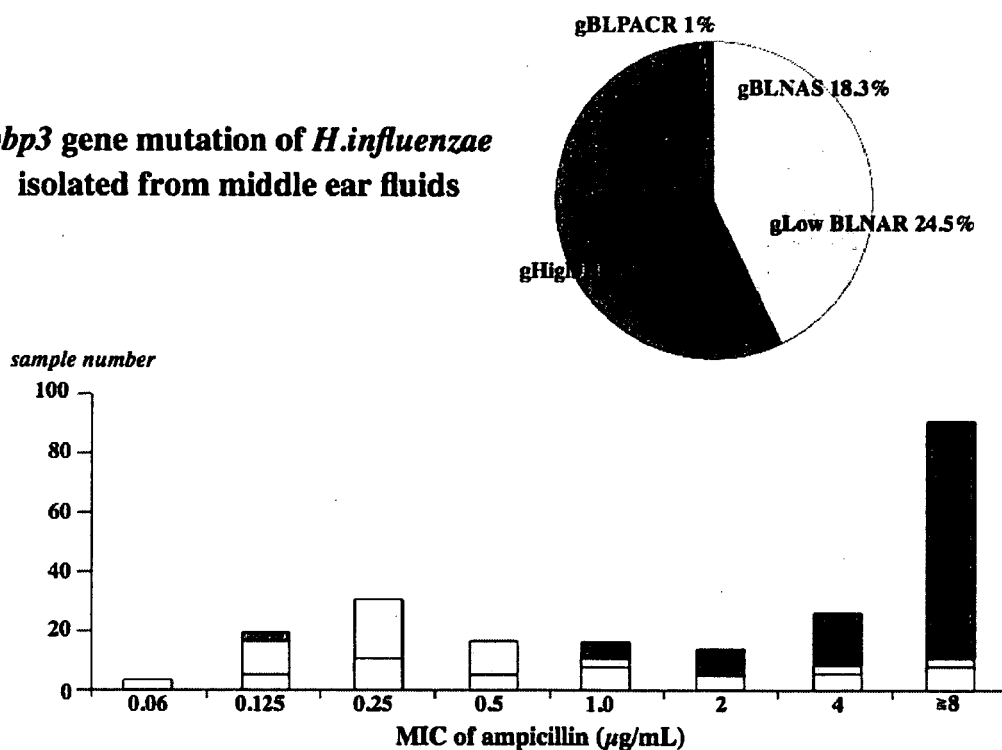
肺炎球菌では 3 遺伝子変異株(gPRSP)が 56%に、1 つ以上の遺伝子変異(gPISP)は 95%に認められた。インフルエンザ菌では PBP 遺伝子変異は 82%に認められ、その内訳は gLow BLNAR; 24.5%, gHigh BLNAR; 56.2%, gBLPACR ; 1%であった。

***pbp* gene mutations in *S.pneumoniae* isolated from middle ear fluids**



☒ 3

***pbp3* gene mutation of *H.influenzae* isolated from middle ear fluids**



☒ 4

3) PFGE によるクローン解析 (図5)

肺炎球菌 Taiwan19F-14, 19F および 3 Japan クローンの流行株、インフルエンザ菌では 26%に同一あるいは類似株を認め、3 主要クローンが本邦に広く伝播していることが判明した。さらに ampicillin に対する MIC が上昇するとともにこれらのクローンの頻度も上昇することが明らかになり、耐性菌がクローン性に伝播し、広まっていることが判明した。

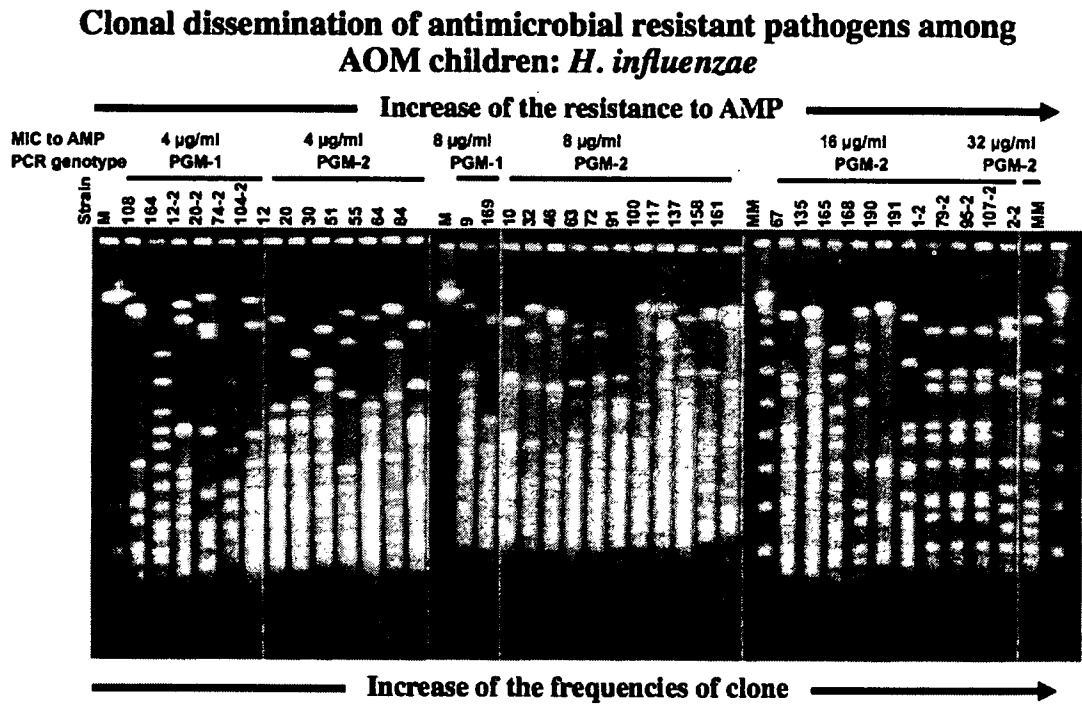


図5

D. 考察

本邦の耳鼻咽喉科専門医による小児急性中耳炎の臨床および分離菌のサーベイランスの検討では、主要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、薬剤耐性化が急速に進行していることが判明した。さらにこれらの分離菌の遺伝子検索では、肺炎球菌およびインフルエンザ菌ともに薬剤感受性に関与するペニシリン結合蛋白遺伝子の変異が高率に認められ、特に肺炎球菌でマクロライド耐性遺伝子である *mefA* および *ermB* 遺伝子の発現もそれぞれ 30%, 57%に認められ、多剤耐性化を来していることが分かった。

パルスフィールドゲル電気泳動法による細菌のクローン解析では、世界的な伝播が認められている Taiwan19F-14 株が小児急性中耳炎症例からも高率に認めら

れたが、本邦独自のクローンも認められ、これらのクローンの解析および本邦からアジアの他の地域への拡散についても検討が必要であると考ええる。インフルエンザ菌のクローン解析の検討は現在まで極めて少なく、まとまった検討は我々の報告が世界で初めてである。本邦において3つの主要クローンの伝播が認められ、さらにこれらのクローンの頻度は耐性が上昇するについて増加する事実から、インフルエンザ菌においても本邦において特徴的なBLNARの増加がクローン性に伝播・拡散していることを明確に示していると考えられた。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がることを広く情報提供することが重要である。

#### E. 発表発表

##### 1. 論文発表

- ① Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, Yamanaka N. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3969-76.
- ② Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Can the Etest correctly determine the MICs of beta-lactam and cephalosporin antibiotics for beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*? *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3463-4.
- ③ Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Arai J, Katsurahara T, Moriyama S, Fujihara K, Yamanaka N. Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex PCR. *Eur J Pediatr* 2007;24:[Epub ahead of print]
- ④ 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;71:269-74.
- ⑤ 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;59:28-34.

- ⑥ 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* 2007;25:2478-84.

## 2. 学会発表

- ⑦ Yamanaka N. Acute rhinosinusitis: Medical therapy. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, December 5-8, 2007, Venezia, Italy
- ⑧ Sugita R, Sugita G, Funaki T, Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Conjunctivitis-otitis media-rhinosinusitis syndrome: Is it a new syndrome? 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, December 5-8, 2007, Venezia, Italy
- ⑨ Hotomi M, Fujihara K, Ogami M, Beder L, Billal DS, Yamanaka N. Prevalence of causative pathogens in acute rhinosinusitis in Japan. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, December 5-8, 2007, Venezia, Italy
- ⑩ Yamanaka N, Hotomi M, Billal DS. Clonal spread of drug-resistant *S.pneumoniae* and *H.influenzae* and disease burden for children in Japan. 12<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. December 4-6, 2007, at Haikou, Hainan, China
- ⑪ Yamanaka N. Clonal spread of drug-resistant *S.pneumoniae* and *H.influenzae*. 12<sup>th</sup> Annual Meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. February 25-26, 2008, Bethesda, Maryland, USA

F. 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

Flt3 ligand プラスミドをアジュバントとした PspA 蛋白粘膜ワクチンの  
肺炎球菌性肺炎に対する効果

分担研究者 大石和徳、大阪大学微生物病研究所

研究要旨： Pneumococcal surface protein A ( PspA ) と plasmid encoding Flt3 ligand ( pFL ) を併用でマウスに経鼻接種し、気道中および血中の PspA 特異抗体誘導、さらにマウス肺炎球菌性肺炎モデルを場とした感染防御効果を検討した。PspA と pFL の併用経鼻接種により、pFL は上気道に FL 蛋白を増加させ、この FL 蛋白は局所に CD11c+樹状細胞を誘導した。この結果、PspA と pFL を併用経鼻接種することで、気道および血中に PspA 特異抗体産生が誘導された。さらに、マウス肺炎球菌性肺炎モデルにおいて、PspA と pFL の併用経鼻接種により、明らかな気道および血中における菌増殖の抑制が認められた。pFL をアジュバントとした PspA 蛋白粘膜ワクチンは肺炎球菌性肺炎の予防に有効と考えられる。

A. 研究目的

現有の肺炎球菌コンジュゲートワクチンは小児において侵襲性感染症のみならず、肺炎の発症を予防する。しかしながら、ワクチン非含有血清型に無効なこと、価格が高価である点が問題である。肺炎球菌の表層に存在する Pneumococcal surface protein A ( PspA ) に対する特異的抗体は異なる遺伝子構造を有する PspA に対しても交叉反応し感染防御効果を示す。肺炎球菌の主要な感染経路は経気道感染であるため、血中の PspA 特異 IgG のみならず、気道粘膜に PspA 特異的 IgA 抗体の産生を誘導することで、肺炎球菌による呼吸器感染症の予防が期待できる。一方、plasmid encoding Flt3 ligand ( pFL ) はその経鼻接種により樹状細胞 ( DC ) を刺激誘導し、粘膜アジュバント効果を発揮することが知られており、粘膜ワクチンへの応用が期待される。

今回、我々はマウスへの PspA 経鼻免疫時 pFL を粘膜アジュバントとして経鼻接

種し、気道中および血中の PspA 特異抗体誘導とマウス肺炎球菌性肺炎モデルを場とした感染防御効果について明らかにする。

B. 研究方法

1) PspA+pFL 経鼻接種による DC 誘導および特異抗体産生誘導

リコンビナント PspA ( rPspA ) 2.5  $\mu$ g と Flt 3 DNA ( pFL ) 50  $\mu$ g を同時に 1 週間間隔で 3 回 C57BL/6 マウスに経鼻免疫した。最終免疫より 1 週間後のマウスより血漿、Nasal Wash ( NW ) および bronchoalveolar lavage fluid ( BALF ) を採取し PspA 特異的抗体量を ELISA にて測定した。

2) 致死的マウス肺炎モデルを場とした PspA 粘膜ワクチンの効果

3 x LD<sub>50</sub> の WU2 血清型 3 株をマウスに経鼻チャレンジすることにより致死的肺炎モデルを惹起した。経鼻粘膜ワクチンの効果は、経鼻接種の 3 回終了した 1 週間

後に WU2 株を経鼻チャレンジし、接種 48 時間後の肺内と血中の菌数を評価した。

### C. 研究結果

#### 1) PspA+pFL 経鼻接種と DC 誘導

マウスに PspA+pFL を経鼻接種すると、コントロールとした PspA+empty plasmid DNA (pORF) と比較して、鼻洗浄液中に FL 蛋白が増加することを確認した。次に、同様に PspA+pFL, コントロールとして PspA+pORF あるいは rPspA のみを経鼻接種し、鼻洗浄細胞 (NP), BALF 中細胞, 脾臓細胞における CD11c+DC の比率を比較した。コントロールに比較して、PspA+pFL 接種により NP および BALF 細胞中に有意な CD11c+DC の増加を認められた。一方、脾臓細胞では CD11c+DC 細胞の増加は認められなかった。

#### 2) rPspA+pFL 投与による特異抗体誘導

rPspA+pFL の経鼻接種により、rPspA+pORF コントロールと比較して、鼻洗浄液 (NW), BALF に明らかな PspA 特異的 IgA 産生が誘導された。rPspA+pFL の経鼻接種により、rPspA+pORF コントロールと比較して、血漿中にも PspA 特異 IgG, IgA, IgM 産生が増加した。また、PspA 特異的抗体産生細胞についても検討した。rPspA+pFL の経鼻接種により、rPspA+pORF コントロールと比較して、nasopharyngeal associated lymphoid tissue (NALT) および NW 中の PspA 特異的 IgA 産生細胞が増加し、頸部リンパ節細胞中、脾臓細胞中には PspA 特異 IgG 産生細胞が有意に増加した。これらの PspA 特異抗体産生細胞の増加は PspA 特異抗体産生誘導の結果支持している。

#### 3) マウス肺炎モデルにおける肺炎予防効果

PspA+pFL, PspA+ORF, PspA のみをそれぞれマウスに経鼻接種し、その後に WU2 株を経鼻接種して致死的肺炎を惹起した。菌接種後の 48 時間後に肺内菌数、菌血症の有無を検討した。PspA+ORF あるいは PspA のみの経鼻接種では、NW 中の菌数は  $10^4$  cfu/ml、肺組織中では  $10^7$  cfu/g であったのに対して、PspA+pFL 経鼻接種では NW と肺組織中に菌が検出されなかった。また、PspA+ORF あるいは rPspA のみの経鼻接種では、80-100% のマウスが菌血症を呈したのに対し、PspA+pFL の経鼻接種マウスでは菌血症は認められなかった。

### D. 考察

pFL の経鼻接種により、pFL は DNA ワクチンとして作用し、上気道に FL 蛋白を増加させ、この FL 蛋白は局所に DC を誘導した。PspA と pFL を併用経鼻接種することで、上気道の M 細胞から取り込まれた PspA 蛋白は DC に効果的に抗原呈示され、気道および血中における PspA 特異抗体を誘導したと推察される。肺炎球菌表層に発現する PspA 分子は補体結合阻止作用を示し、菌の病原性因子と考えられることから、PspA 特異抗体はこの PspA 自身の補体結合阻止活性を消去し、菌表面への補体結合を容易にすることで、菌のオプソニン化を促進すると考えられる。とりわけ、気道に誘導された PspA 特異 IgA は WU2 株の経鼻接種直後の上気道における菌定着を阻止した可能性が示唆される。

### E. 結論

pFL をアジュバントとする PspA 経鼻粘膜ワクチンは、気道中への DC の動員を介



して、気道中に PspA 特異 IgA、血中には PspA 特異的 IgG, IgA, IgM を誘導し、結果的にマウス肺炎モデルにおける鼻洗浄液および肺組織中の菌増殖を有意に抑制した。pFL を粘膜アジュバントとする PspA 経鼻粘膜ワクチンの肺炎球菌性肺炎に対する予防効果が確認された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawakami K, Masaki H, Nagatake T, Sueyoshi Y, Iwanaga T, Aizawa M, Oishi K. Comparative immune response of patients with chronic pulmonary diseases during the 2-year period after pneumococcal vaccination. Clin. Vac. Immunol 14:139-145, 2007
2. 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
3. Anh DD, Huong PLT, Watanabe K, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phuong DM, Tanimura S, Ohkusa Y, Nagatake T, Watanabe H, Oishi K. Increased rates of intense nasopharyngeal bacterial colonization of Vietnamese Children with radiological pneumonia. Tohoku J Exp Med 213: 167-172, 2007.
4. Watanabe K, Anh DD, Huong PH, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong DM, Rusizoka OS, Nagatake T, Watanabe H, Oishi K. Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. Pediatrics International (in press)
5. Watanabe H, Batuwanthudawe R, Thevanesam V, Kaji C, Qin L, Nishikiori N, Saito W, Saito M, Watanabe K, Oishi K, Abeysinghe N, Kunii O. Possible prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka. Intern Med. 46:1395-1402, 2007.
6. Dimaano E, Saito M, Honda S, Miranda EA, Alonzo MT, Valerio MD, Mapua CD, Inoue S, Kumatori A, Matias R, Natividad FF, Oishi K. Lack of efficacy of high dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. Am J Trop Med Hyg 77: 1135-1138, 2007
7. Yoshii H, Kamiyama H, Amanuma H, Oishi K, Yamamoto N. Mechanisms underlying glycosylation-mediated loss of ecotropic receptor function in murine MDTF cells, and its implication for receptor evolution. J Gen Virol 89:297-305, 2008

8. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, Arai T, Takada T, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ichihata T, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Nukiwa T, Sakatani M, Krischer JP, Nakata K. Characteristics of a large cohort of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis patients in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)
9. 川上健司、大石和徳. 肺炎球菌ワクチンの最新事情と渡航者の接種. *日本医事新報* 4366:71-74, 2007.
10. 川上健司、大石和徳. 予防接種の現状と対策2 細菌に対するワクチン治療学 41:18-20, 2007.
11. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチン再接種の是非. *日本医事新報*, 4354: 98-99, 2007.
12. 大石和徳. 日本内科学会雑誌. 肺炎球菌ワクチン-5年後の再接種の是非-. *日本内科学会雑誌*, 2008 (印刷中).
2. 学会発表
1. 陳 蒙、黒木麗喜、吉嶺裕之、有吉紅也、大石和徳: HIV感染成人による肺炎球菌コンジュゲートワクチンによる血清中オプソニン活性と増強効果. 第55回日本化学療法学会西日本支部総会, 神戸, 2007年10月29-31日.
2. 古本朗嗣、大日康史、大石和徳: 慢性肺疾患患者における急性増悪びに対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの相加的効果. 第11回日本ワクチン学会、横浜、2007年12月8-9日.
3. 大石和徳、高橋俊司. アナライザーワークショップ:  $\beta$ 溶血性連鎖球菌. 第19回に本臨床微生物学会総会、東京、2008年1月26-28日.
4. Oishi K. Antibiotic resistance of pneumococci and other respiratory bacteria in Asian countries: 12<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim 4-6 December 2007, Haikou, Hainan, China
5. Oishi K, Oma K, Jizi Zhao, Ryuichi Uchida. Nasal immunization with recombinant pneumococcal surface protein A with mucosal adjuvants, such as pFL or TLR ligand, provide protective immunity against pneumococcal pneumonia in mice. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infection Panel. 25-26, February, 2008, Bethesda, Maryland, USA.
- 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

「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」

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  
共同研究者：鈴木陽、藤直子、古瀬祐気、神垣太郎、清水みどり

「マスワクチンキャンペーン後の輸入麻疹ウイルス(フィリピン、2000年-2007年)」

### 研究要旨

2000年から2007年の間にフィリピン熱帯医学研究所に麻疹サーベイランスとした集められた血清より、麻疹ウイルスをPCRにて検出し、過去に流行した株の同定を行った。2000年から2004年までは、PCR陽性であった検体すべてがD3リニアージであったが、ワクチンキャンペーン後の2007年に検出された株は、D8およびG3リニアージに分類され輸入麻疹が示唆された。

#### A.背景

麻疹はワクチンによって予防可能な感染症であるにもかかわらず、日本をはじめとする国々で流行を認めており、WHOの報告によると2006年に全世界で24万人の死亡者を出しているが、そのほとんどが発展途上国であるとしている。フィリピン保健省は、1998年より麻疹対策としてマスワクチンキャンペーンおよび麻疹サーベイランスを行っている。マスワクチンキャンペーンはすでに1998と2004年の2回行われており、麻疹サーベイランスは発疹を伴った発熱患者からの麻疹IgM検出を行っている。現在まで流行状況の把握に留まっており、流行し

た麻疹ウイルスに関するウイルス学的調査は行われていなかった。そこで、保存患者血清より麻疹ウイルスの検出を行い、過去にフィリピンで流行した麻疹ウイルスの遺伝子学的解析を行った。

#### B.方法

麻疹サーベイランスとして採取されマイナス80°Cに保存されていたIgM陽性患者血清より、ウイルスRNAを抽出し、nested PCRにて麻疹ウイルスHおよびN遺伝子を検出した<sup>1,2</sup>。陽性であった検体について、ウイルス遺伝子塩基配列の同定を行った。

表 1. 麻疹 IgM 陽性検体数および PCR 対象検体数

Year	麻疹 IgM 陽性検体	PCR 対象検体数
2000	2193	35
2001	2143	35
2002	2124	35
2003	1081	35
2004	155	35
2005	0	Not tested
2006	3	3
2007	158	64
Total	7836	242

結果

2000 年から 2007 年までの 8 年間に おいて、合計 9,872 検体が麻疹サーベイランスとして RITM に提出された。(表 1)2003

年に検体数が半減したが、これは定点医療施設から一部外れたためである。2004 年より陽性検体数が激減し、2005 年には提出検体が 71 件、IgM 陽性検体が 0 件まで減少していた。しかし、2006 年より増加に転じ、2007 年には提出検体が 518 件、IgM 陽性検体が 158 件となった。2000 年から 2004 年までは年間 35 例を無作為抽出し、2006 年は全 4 例、2007 年は流行した地域ごと合計 64 検体抽出し、合計 242 検体の保存血清より麻疹ウイルスの検出を試みた。H 遺伝子では 50 検体、N 遺伝子では 29 検体が陽性となり、それらの PCR 産物の塩基配列を同定し、WHO のレファレンス株と比較した。(図 1)2000 年から 2004 年までに採取された検体すべてにおいて、麻疹ウイルスは D3 リニアージに分類された。一方、2007 年に採取された検体は、D8 および G3 に分類された。

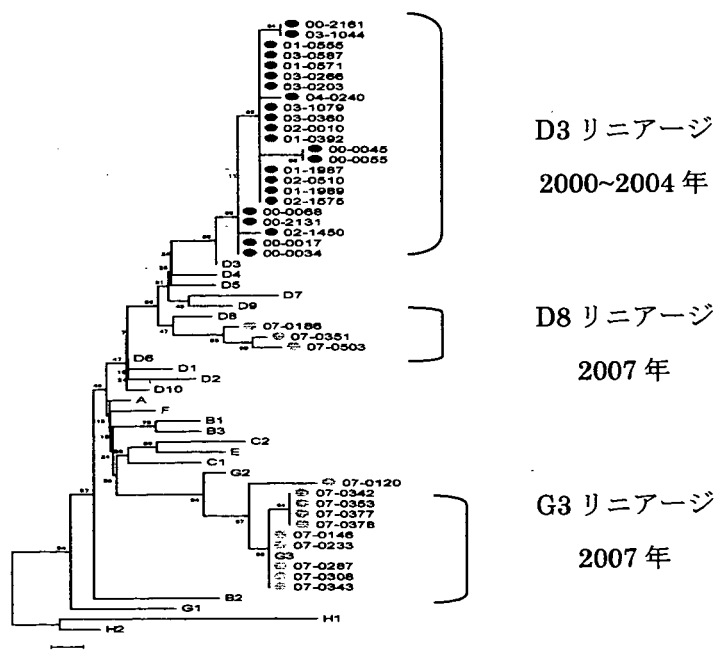


図 1 麻疹ウイルス H 遺伝子(296bp)による NJ 法で作成した系統樹

## 考察

フィリピン保健省は、麻疹対策としてマスワクチンキャンペーンおよび麻疹サーベイランスを実施しているが、この麻疹対策に対する評価は行われていなかった。1998年に第一回目のワクチンキャンペーンが行われたが、フォローアップが行われなかったため麻疹ウイルス感受性者が人口流入とともに自然増加し、結果的にフィリピン国内での麻疹流行を阻止できなかったと考えられる。2004年の2回目のキャンペーン後、報告患者および麻疹 IgM 陽性患者が激減しており、マスワクチンキャンペーンの効果があったことが実証されている。しかしながら、2006年以降、報告患者および麻疹 IgM 陽性患者が増加に転じている。これも、1998年以降のパターン同様、患者数の増加は麻疹感受性者の増加に伴う必然的な現象と考えられる。麻疹のように感染率が高い病原体のワクチン対策において、感受性者を限りなく0にすることが必要であり、これには生後1年以内の麻疹ワクチン接種の徹底が出来ない限り定期的なマスワクチンキャンペーンが必要である。

2000年から2004年まで採取された患者血清から D3 の麻疹ウイルスのみが検出されたことより、D3 がフィリピンに土着の流行株であったことが推測された。2006年からは、今まで検出されていた D3 が一例もなく、かわりに D8 および

G3 が検出された。これは、ワクチンにより感受性患者の割合が激減し、感染輪が絶たれたことをウイルス学的に証明している。さらに、いままで検出されなかった新たなリニアージが検出されたことは、これらの株が他の地域から持ちこまれた輸入症例である可能性を示唆している。今回の我々のウイルス学的検討は、無作為抽出と全数の調査を行っていないため、D3 以外の株が2004年までに流行していたことを完全に否定できない。また、我々が使用した PCR プライマーがすべてのサブタイプを検出できていない可能性が考えられる。保存血清からのウイルス RNA の検出効率も低い、これは他の報告と同様の結果である<sup>4,5)</sup>。ウイルス学的解析を行うためには、麻疹ウイルスの分離が必要となる。しかし、現行のサーベイランスシステムでは血清しか採取しないため、今後は咽頭拭い液などウイルス分離に適した検体採取が望まれる。

## 研究発表

1. 論文発表: 無
2. 学会発表:
  - 藤直子他、第六回感染症沖縄フォーラム (2008年1月 沖縄)
  - N.Fuji et al. 13th International Congress on Infectious Diseases (Malaysia, June 2008).

### 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

平成 19 年度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

新たな H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス診断系の構築  
および H5-LAMP 検査キットの改良

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

協力研究者 影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠

（国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室）

**研究要旨** 現在、流行している高病原性 H5N1 鳥インフルエンザは、赤血球凝集素 (HA) 蛋白の遺伝的系統から、主に 2 つのグループ (Clade 1 および 2) に分類され、また、2006 年以降は Clade 2 はさらに 3 つの sub-clade に細分されるようになった。こうした遺伝的な違いに関係なく、全ての流行株を正確に検出できる検査系の確立は、新型インフルエンザの対策上、非常に重要である。本研究では、TaqMan Probe 法を利用した Real-time RT-PCR 法により、迅速かつ高感度に H5N1 株を検出できる検査系を新たに構築し、検出感度および特異性を検討した。また、従来のプライマーを修正変更した改良 H5-LAMP 検査キットが最近の流行株にも対応するかどうか検討を行った。

**A. 研究目的**

2003 年末から東南アジア地域を中心に高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ (H5N1-HPAI) が再流行し、感染地域はさらに中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと拡がりをみせている。東南アジアなど多くの流行国では、病死した鳥との濃厚接触により感染する例が多く、現時点で 14 カ国 371 人の感染例と 235 人の死亡例が確認されている。ヒトからヒトへの感染を疑わせる事例もいくつか報告されているが、感染患者との濃厚接触による家族内感染に限定されている。ヒトから分離されたウイルスは、未だ鳥型の性状を維持しているため、効率的なヒト-ヒト感染は起きていないが、ヒト-ヒト感染し易いような変異が起こる

可能性もあり、これらウイルスに由来する新型インフルエンザの発生が懸念されている。

現在流行している H5N1-HPAI は、赤血球凝集素 (HA) の遺伝的系統から主に 2 つのグループ (Clade 1 および 2) に分類され、また、2006 年以降は Clade 2 はさらに 3 つの sub-clade に細分されている。Clade 1 は、主にベトナムで 2004 年以降に流行した株、Clade 2.1 は、主にインドネシアで 2005 年以降に流行している株、Clade 2.2 は中国青海湖、中東、アフリカ、ヨーロッパ等の地域で流行している株、Clade 2.3 は主に中国南部で流行している株が含まれる。

H5N1-HPAI の診断には、こうした遺伝的な違いに関係なく、全ての H5N1-HPAI 流行

株を高感度かつ特異的に検出できる検査系でなければならない。以前に感染研ウイルス3部で開発した Conventional RT-PCR 法による H5N1-HPAI 検出法は、これら Clade に関係なく全ての流行株を検出する事ができるが、変異の蓄積により将来、検出感度あるいは特異性が低くなる可能性があり、この検出法を補完するためにも新たに検出系を構築する必要があった。そこで、より迅速にかつ高感度に検出できる TaqMan Probe 法による Real-time RT-PCR 法を用いた検査系の構築を新たに行い、各 Clade に対する反応性を調べた。

また、現在、市販されている感染研と栄研化学とで共同開発した H5-LAMP 検査キットは、Clade 1 および 2.1 に対する反応性は高いが、Clade 2.2 および 2.3 に対する反応性は顕著に低い事が明らかとなっている。そこで、最近の流行株を捉えられるよう、プライマーを修正変更したキットの改良を行い、各 Clade に対する反応性を調べた。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. TaqMan Probe 法による Real-time RT-PCR 法検査系の構築

これまでに報告されている H5N1-HPAI 流行株及びその他の A 型インフルエンザウイルスの M、HA 及び NA 遺伝子配列を詳細に解析し、A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子、H5N1-HPAI の HA 及び NA 遺伝子のみを検出するための Primer 及び TaqMan probe を設計した。次に、最近の流行株を含む様々な H5N1-HPAI 株および H5N1 以外の H1-H15 あるいは N1-N9 の A 型インフルエンザウイルスより抽出した RNA を用いて、A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子、H5N1-HPAI の HA 及び NA 遺伝子検出系の特異性および検出感度の検討を行った。

### 2. H5-LAMP 検査キットの改良

Clade 2.2 および 2.3 にも対応できるように、H5-LAMP 用 Primer を修正変更し、最近の流行株を含む様々な H5N1-HPAI 株より抽出した RNA を用いて、検出感度および特異性の検討を行った。

## C. 研究結果

### 1. TaqMan Probe 法による Real-time RT-PCR 法検査系の新たな構築

今回、新たに構築した A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子をターゲットにした TaqMan Probe 法による Real-time RT-PCR 検出系では、A 型インフルエンザウイルスのみを高感度かつ特異的に検出する事ができた。また、H5N1-HPAI の HA 及び NA 遺伝子をターゲットにした検出系では、H5N1-HPAI 以外の HA (H1-H15) および NA (N1-N9) に対しては反応性を示さず、H5N1-HPAI の Clade 1、2.1、2.2 および 2.3 の全ての Clade に対しては、高感度かつ特異的に検出できる事が明らかとなった。以上により、A 型インフルエンザウイルスおよび H5N1-HPAI を特異的かつ高感度に検出可能な、TaqMan Probe 法を利用した Real-time RT-PCR 法による核酸検出系を確立する事ができた。

### 2. H5-LAMP 検査キットの改良

改良した H5-LAMP 検査キットは、Clade 1 および 2.1 に対する反応性は、改良前のキットと同等であった。また、改良前には反応性が低かった Clade 2.2 に対して、高感度に反応するようになったが、Clade 2.3 に対しては反応性が低いままだった。Real-time RT-PCR 法と感度を比較すると、Clade 1、2.1 および Clade 2.2 に対しては 1-1/10、Clade 2.3 に対しては 1/100 の感度であった。改良した H5-LAMP 検査キットは、Clade 2.3 に対してのみ反応性が低く、全ての Clade を高感度に検出するためには、さらなる改良が必要である。



#### D. 考察

東南アジア地域における H5N1-HPAI の流行は、未だ制圧できていない。これらの地域では、家禽は裏庭で飼育されており、今後も家禽での流行が頻発するとともに、ヒトへの感染例も増加すると予想される。そうした流行を繰り返すうちに、抗原性あるいは遺伝子配列が異なる変異株も出現すると予想され、こうしたウイルス変異に対しても、正確に感染診断を行う検査キットや試薬類の開発が新型インフルエンザの対策上求められている。

本研究により TaqMan Probe 法を用いた Real-time RT-PCR 法による、高感度かつ特異的な H5N1-HPAI の核酸検出系を確立する事ができたが、今後はあらたに出現する流行株に対しても想定した検出感度を維持できているかどうかを把握し、必要時には Primer あるいは Probe の改良を適宜行う必要があると考えられた。また、改良した H5-LAMP 検査キットでは、Clade 2.3 に対する反応性が低いことから、全ての H5N1 流行株を確実に捉えることができるようプライマー配列の全面的な見直しや反応試薬の改良を行う必要があると考えられた。

特に遺伝子検査系では、インフルエンザウイルスのように変異の激しいものをターゲットとする場合、複数種の検査系を確立しておき、一つの検査系が機能しなくなっても、他の検出系でカバーできる態勢も必要不可欠である。こうした検出系はそれぞれ利点および欠点を考慮し、検査を複数組み合わせるなどして、常に最良の結果を出す事が重要である。本研究で構築された検査系および得られた知見は、今後の新型インフルエンザ対策、特に感染診断に大きく貢献するものと思われる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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* 141, 173-180, 2007
- 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* 25, 3557-3560, 2007
- Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.*;88(6):403-14, 2007.
- Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-819, 2007
- B. Darmma, A. Klimov, T. Odagiri, A. Burma, S. Tsatsral, N. Naranbold, D. Enkhsaikhan, P. Nymadawa. Characteristics of influenza virus epidemic strains in 2005-2006 season in Mongolia. *Mongolia J. Infct. Dis. Res.* 14, 2-6, 2007
- Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation

with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20

・ Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1333-40.

・ Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-9, 2007.

・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. *J. Virol.* 82, 728-739, 2008

## 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 年度稀少感染症診断技術研修会 2 月 (2007)

・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri The cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles for the production of influenza virus. *Options for the Control of Influenza VI*, Tronto, June, 2007.

・ CA Russell, TC Jones, IG Barr, NJ Cox, K Fukuda, V Gregory, I Gust, AW Hampson, AJ Hay, AC Hurt, JC de Jong, AI Klimov, AS Lapedes, YP Lin, A Mosterin, T Odagiri, ADME Osterhaus, GF Rimmelzwaan, MW Shaw, E Skepner, K Stohr, M Tashiro, WQ Zhang, RAM Fouchier, DJ Smith Global patterns in the evolution and epidemiology of influenza A(H3N2) virus from 2002 to 2007. *Options for the Control of Influenza VI*, Tronto, June, 2007.

・ Takato Odagiri International support for

influenza surveillance and control in Lao PDR. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

・ Takato Odagiri Update of influenza surveillance information and vaccine strain selection-Northern and Southern Hemisphere. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

・ 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 2006/07 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 19 年度のワクチン株 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・ 川上千春、小淵正次、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代真人 インフルエンザ市中流行株における NA 阻害薬耐性 A 型ウイルスの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・ 高橋宣聖、阿戸学、北原玄太、二宮愛、小田切孝人、田代真人、小林和夫 H5N1 型プレパンデミックワクチンによる感染防御メカニズムの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・ 今井正樹、影山努、氏家誠、納富継宣、峰川晴美、田代真人、小田切孝人 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法による H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検出系の開発 II 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・ 影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人、小田切孝人 Real-time RT-PCR 法による H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス核酸検出系の構築 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・ 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎 マウスにおけるプレパンデミックワクチンによるプライミング効果の検討 第 11 回日本ワクチン学会 横浜 12 月、2007

## F. 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（社会保障国際協力推進研究事業）  
（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年夏、モンゴルの湖沼で死亡野鳥が発見され、死亡したオオハクチョウの臓器材料からH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスA/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1)（以下モンゴル株）が分離されたことをこれまでに報告した。感染実験により、本ウイルスは2週齢のアイガモに対して致死的な病原性を示すことが明らかとなった。そこで、リバーシジェネティクス法を用いてこの病原性に関与する遺伝子分節の特定を試みた。その結果、モンゴル株のカモに対する病原性にはPB2、NPおよびNS遺伝子が関与していることが明らかとなった。また、2007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。野生水禽の糞便1,692検体から36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H1、H3、H4、H5、H7、H8、H10、H11、H12の9つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H3、N4、N5、N6、N7、N8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、136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

A/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1)株（以下モンゴル株）の8本の遺伝子分節をクローニングし、人工的にウイルスを合成した。さらに、2週齢アイガモに対して病原性

を示さないA/Hong Kong/483/97 (H5N1)株の8本の遺伝子分節も同様にクローニングし、人工的にウイルスを合成した。これらのウイルスおよびこれら2つのウイルスの遺伝子再集合ウイルスを作製した。これを2週齢アイガモにそれぞれ接種し、モンゴル株がカモに対して致死的な病原性を示すことに関与する遺伝子分節の特定を行った。

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

リバーシジェネティクス法で作成された2つの親ウイルス（モンゴル株とA/Hong Kong/483/97 (H5N1)株）のカモに対する病原性は、野外で分離されたオリジナルウイルスのそれと同じであった。また、モンゴル株のPB2、NPまたはNS遺伝子をA/Hong Kong/483/97 (H5N1)株のそれと置き換えた遺伝子再集合ウイルスはカモに対する致死

的な病原性を失った。以上の成績から、モンゴル株のカモに対する病原性にはPB2、NPおよびNS遺伝子が関与していることが明らかとなった。現在その分子メカニズムを詳細に解析中である。

野生水禽の糞便1,692検体から36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H1、H3、H4、H5、H7、H8、H10、H11、H12の9つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H3、N4、N5、N6、N7、N8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、136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 (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/vdbportal/view/index.jsp>)。

#### D. 考察

H5N1モンゴル株の水禽に対する病原性の分子基盤が明らかとなりつつある。また、本年のグローバルサーベイランスでは、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も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) Fujii, K., Kakumoto, C., Kobayashi, M., Saito, S., Kariya, T., Watanabe, Y., Sakoda, Y., Kida, H., and Suzuki, M. (2007). Serological evidence of influenza A virus infection in Kuril harbor seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*

69, 259-263.

- (2) Guo, C. T., Takahashi, N., Yagi, H., Kato, K., Takahashi, T., Yi, S. Q., Chen, Y., Ito, T., Otsuki, K., Kida, H., Kawaoka, Y., Hidari, K. I., Miyamoto, D., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (2007). The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptor s. *Glycobiology* 17, 713-724.
- (3) Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawaoka, Y., Ogasawara, K., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.
- (4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., and Kida, H. (2008). Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci.* in press
- (5) Ozaki, H., and Kida, H. (2007). Extensive accumulation of influenza virus NS1 protein in the nuclei causes effective viral growth in vero cells. *Microbiol Immunol* 51, 577-580.
- (6) Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokuai, N., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine.* in press
- (7) Shin, J. H., Sakoda, Y., Kim, J. H., Ochiai, K., and Umemura, T. (2007). Comparison of antibody titers in rabbits following immunization with inacti