

図1 生きたオオクロバエを摂食するニワトリ

オオクロバエに対するオリセットネットの殺虫効果

分担研究者 小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 富田隆史（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
葛西真治（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
駒形 修（国立感染症研究所昆虫医科学部）

**研究要旨** オオクロバエは、冬季にわが国の畜舎に侵入するハエ類の中でもっとも主要な種である。オリセットネットは、ピレスロイド系殺虫成分のペルメトリンをその繊維の中に含む蚊帳の一つで、海外のマラリア流行地域でマラリア感染を防ぐために開発されたものである。オリセットネットの畜舎への設置がオオクロバエの防除に有効であるかを検討するために、オリセットネット接触がもたらす致死効果を試験した。麻酔なしオオクロバエ成虫を一定時間オリセットネットに接触させ 24 時間後の生存を観察する限定時間接触法により、接触による半数致死時間は、雌では約 30 秒、雄では 30 秒以内と推定し、基礎試験としてのオリセットネットの有効性が示された。

**A. 研究目的**

わが国の鶏舎における高病原性トリインフルエンザ(HPAI)の発生は、寒期に飛来する渡り鳥によりもたらされると考えられている。しかしながら、感染した渡り鳥から病原体がどのようなルートで鶏舎のニワトリに伝播したかについては未解明である。オオクロバエは冬季にも活動する大型のハエである。2004 年 2 月に京都府内の鶏舎で H5N1 型 HPAI が発生した際には、発生現場の周辺ではハエ類としてオオクロバエが最も多く捕集され、捕集されたオオクロバエとケブカクロバエからは高い頻度で病原体ウイルスが検出された(Sawabe et al. 2005)。これらのハエは動物の糞を摂食することで、病原体を体内に取り込むか体表面に付着させることができる。鶏舎への HPAI の感染ルートが未解明である現状を考慮すれば、HPAI 対策として冬季に活動するハエ類の防除にも取り組む必要がある。

畜舎で発生するハエ類の防除には、動物用医薬品として虫体や発生源へ直接噴霧する薬剤、残留噴霧剤、毒餌剤などが登録され、使用されている。オオクロバエは飛翔能力が高く、鶏舎に飛来するオオクロバエのほとんど全てが他所で発生したものとみなされる。したがって、トリインフルエンザのアウトブレイク阻止の

観点からは、本種の鶏舎への侵入を防ぐことが最も重要な対策となる。しかし、既登録薬剤では十分にこの目的が達せられないと予想される。殺虫成分であるペルメトリンを繊維に包含するオリセットネットは、本来、マラリア流行地においてハマダラカのヒトへの夜間吸血を防ぐために開発された資材である。オリセットネットと同等な性状と機能をもつ防除ネットが鶏舎におけるハエ類の侵入の防御手段として有効であるかを評価するために、オオクロバエを用いオリセットネットの殺虫効力に関する試験を行った。

**B. 研究方法**

ハエ： 2006 年 11 月の鹿児島県出水市における採集に基づいて作られたオオクロバエ出水コロニーを 6~9 世代継代したものを供試した。幼虫には牛レバーを、成虫には砂糖と牛レバーを摂食させた。飼育は 20℃、D:L=11:13 の環境で行った。羽化後 7~12 日目の成虫を供試した。殺虫試験は 25℃室温で行った。

1. ペルメトリン局所施用試験： アセトンに溶解したペルメトリンを炭酸ガスで麻酔したハエの胸部背面に 0.5 uL 滴下した。その後、ハエは給水脱脂綿を置いたナイロンメッシュケージに移し、24 時間後の死亡（ノックダウン

含む)を観察した。

2. オリセットネット継続接触試験: 13 X 13 X 19 cm<sup>3</sup>の直方体をなすステンレスフレームの全面をその外部からオリセットネットで密着するように覆ったケージを試験毎に新たに作成した。このケージの一つの側面(13 X 13 cm<sup>2</sup>)は、作業用の袖となっており、袖を開くことによりハエの投入と回収を行えるようになっている。炭酸ガス麻醉下で雌雄を分別し、麻醉後1時間以上経過し完全に麻醉から覚醒したハエを供試した。オリセットネット・ケージに吸虫管を用いて捕集した10頭の雌バエを一度に投入し、一定間隔時間後毎のノックダウンを観察した。ハエがケージの底面で転倒し静止に至った状態をノックダウンと判定した。この試験を10回反復した。

3. オリセットネット限定時間接触試験—麻醉下: 炭酸ガスを下方より引いたブフナーオートの上にもろ紙を敷き、その上にオリセットネットの小片を敷いた。予め炭酸ガスで十分に麻醉させたハエをピンセットを用いて数頭毎にオリセットネット処理面に移した。ハエは腹面を下にしてオリセットネットの上に置き、一定時間接触させた後、ナイロンメッシュケージに移し、水を与え、24時間後の死亡(ノックダウンを含む)を観察した。オリセットネット接触面の共用を避けるようにハエは配置し、ネット小片は頻繁に新しい物に交換した。

4. オリセットネット限定時間接触試験—麻醉なし: 炭酸ガス麻醉下で雌雄を分別し、麻醉後1時間以上経過し完全に麻醉から覚醒したハエを供試した。オリセットネット・ケージにハエを投入し、一定時間後に回収し、ナイロンメッシュケージに移し、水を与え、24時間後の死亡(ノックダウン含む)を観察した。ハエのオリセットネット・ケージへの投入と取り出しは吸虫管を用いて1頭毎に行った。オリセットネットは約60頭の試験を終える毎に、新しいネットに交換した。

プロビット解析: バイオアッセイのプロビット解析にはSPSS ver.10 (SPSS Inc.)を使った。

## C. 研究結果

### 1. ペルメトリン局所施用試験(表1, 図

1): 雌と雄に対するペルメトリンのLD50値は、それぞれ、0.114 µg/flyと0.106 µg/flyであった。プロビット回帰の直線性から有意に外れたため、信頼限界の推定はできなかったが、LD50値に大きな性差はなかった。試験に用いた出水コロニーの雌と雄の羽化後10日目の平均体重(144.9 mg, N=64; 127.0 mg, N=103)に基づき、体重あたりの値にLD50を換算すると、雌雄それぞれ、0.788 µg/gと0.838 µg/gと表された。一方、イエバエの殺虫剤感受性SRS系統の雌の体重あたりのペルメトリンLD50値は、0.350 µg/gと推定されている(Komagata et al. 2006)。体重あたりの効力の比較によっては、オオクロバエ出水系統のハエはイエバエの感受性系統とほぼ同レベルの感受性を有しているといえた。

2. オリセットネット継続接触試験(表2, 図2): オリセットネット・ケージに雌を閉じこめて自由に行動させ、一定時間間隔でノックダウンを観察した。試験を10回反復して得たKT50の平均値は324.7 sec (SD=23.9 sec)と求まった。

3. オリセットネット限定時間接触試験—麻醉下(表3, 図3): 麻醉を施したハエの腹面をオリセットネットに一定時間接触させ、24時間後の死亡を観察した。接触時間60秒と120秒では、雌と雄のいずれも正常虫数が死虫数を上回り、効力が十分に表れないことが示された。一方、雄に対する接触効果は雌に対する効果より大きい傾向が窺えた。

4. オリセットネット限定時間接触試験—麻醉なし(表4, 図3): 麻醉を施していないハエをオリセット・ケージ内に放ち、一定時間後に回収し、24時間後の死亡を観察した。雌のLT50値は29.7 sec (95% CL: 23.2 -- 36.9 sec)と推定された。雄では設定した内で最短の接触時間15秒ですでに90%の死亡率を示したためにLT50値を求めることができなかったが、雄のLT50値は15秒以内と表される。本試験における雄への雌に比べた効力の高さは、上に述べた局所施用試験と麻醉下限定時間接触試験の効力に示された性差では説明が難しい。60秒間と120秒間オリセットネットにハエを接触させた場合、麻醉をかけないハエの方が麻醉下のハエ

よりも明らかに殺虫効果が高かった。この違いは、ハエがネットの上を歩行することによりペルメトリンを脚により多量に付着したことによるものと説明できる。

#### D. 考察

オオクロバエは年に一峰性の発生をし、春先に羽化し、雌成虫は寿命が長いもので約1年間生存する。晩秋および冬季に腐肉トラップに誘引されるオオクロバエのほとんどは雌である。国内でのトリインフルエンザの伝播にオオクロバエがもし関与し、それを防除する必要があるとすると、冬季におけるこのハエの雌成虫の防除にオリセットネットが有効かどうか、まっ先に問われるべきである。

麻酔を施していないオオクロバエを用いた試験からは、雄では15秒以内のオリセットネットへの接触で、雌では約30秒の接触で半数が死亡することが確かめられた。この試験において60秒以内では目視で明らかな麻痺は認められず、大部分の供試虫はネットの上を歩行していた。試験に用いたオリセットネット・ケージのサイズに制約があったことや、室内で継代飼育中のコロニーを用いたことから、オリセットネット・ケージの中で示した供試虫の行動は、野外のオオクロバエが同じオリセットネットに飛来して停留する場合と単純には比較できないことに留意する必要がある。

腐肉トラップや鶏舎のニワトリに誘引されて飛来するハエがオリセットに阻まれて一時的にネットの上に停留をする場合、野外ではどれくらい長時間停留するかが実用性に係わる鍵の一つとなるであろう。実地試験においては、誘因物の質/量、誘因物のネットからの距離等も停留時間に影響すると考えられる。ハエのオリセットネット停留中に、ノックダウンに先立つごく軽度の麻痺、または有効成分に対する接触忌避が生じる場合、それにより停留時間の低下をきたし、殺虫効果の実用性に問題が生じないかについて、さらに検討してゆく必要がある。

#### E. 結論

オオクロバエ成虫がオリセットネット上に留まる際の半数致死時間を30秒またはそれ以内と推定した。オリセットネットを利用する防護ネットが畜舎に飛来するオオクロバエの防除に有効である可能性が室内試験の範囲で示された。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

駒形修, 葛西真治, 小林睦生, 富田隆史, オオクロバエに対するピレスロイド含有網の室内試験による評価, 第60回日本衛生動物学会大会, 2008年4月19日(予定).

#### H. 知的財産の出願・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

表1. ベルメトリン局所施用試験

Dose (ng/fly)	Females			Males		
	No. test	No. died	Mortality	No. test	No. died	Mortality
0	100	1	0.010	177	1	0.006
63	30	5	0.167	30	6	0.200
100	30	7	0.233	30	13	0.433
126	30	14	0.467	30	13	0.433
159	30	28	0.933	30	28	0.933

表2. オリセットネット継続接触試験

Sec	Replication																				
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		
	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	NT	NK	
170							9	1													
180							9	1													
210							9	1													
221	10	1																			
240	10	3			10	1	9	1							10	1					
243											10	1									
245			10	1																	
255														10	1						
270	10	4	10	1	10	1	9	1			10	2	10	2	10	1	10	1			
300	10	6	10	3	10	2	9	2			10	3	10	3	10	2	10	4			
311									10	1											
313																				10	1
330	10	7	10	6	10	5	9	6	10	2	10	5	10	5	10	2	10	5	10	3	
360	10	7	10	9	10	7	9	8	10	6	10	8	10	6	10	6	10	5	10	6	
390	10	9	10	9	10	9	9	9	10	6	10	10	10	9	10	8	10	8	10	8	
420	10	10	10	10	10	9			10	8			10	10	10	9	10	9	10	10	
450					10	10			10	9					10	10	10	10			
480									10	10											

Sec: Contact time in sec.

NT: Number tested

NK: Number knockdowned

表3. オリセットネット限定時間接触-麻酔下

Time (sec)	Females			Males		
	No. test	No. died	Mortality	No. test	No. died	Mortality
0	20	0	0.000	63	4	0.063
60	38	2	0.053	40	11	0.275
120	38	6	0.158	40	12	0.300

表4. オリセットネット限定時間接触-麻酔なし

Time (sec)	Females			Males		
	No. test	No. died	Mortality	No. test	No. died	Mortality
0	10	0	0.000	13	0	0.000
15	30	8	0.267	30	27	0.900
30	31	13	0.419	30	26	0.867
60	30	23	0.767	30	29	0.967
120	30	30	1.000	30	30	1.000

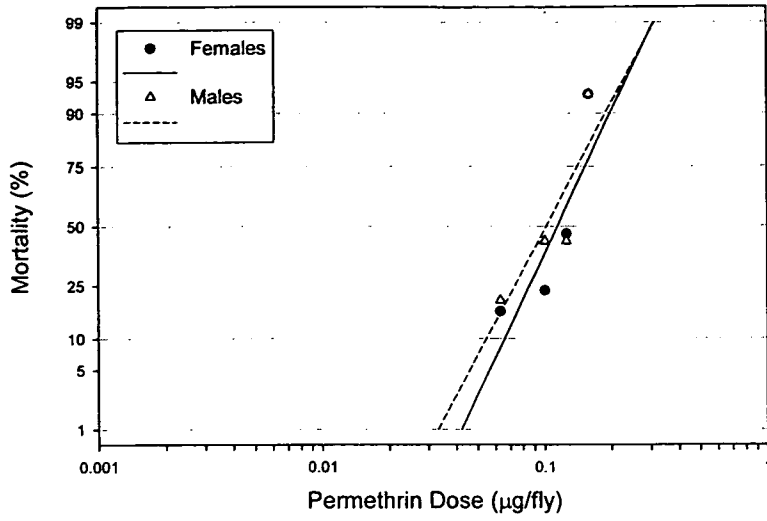


図1. ペルメトリン局所施用試験

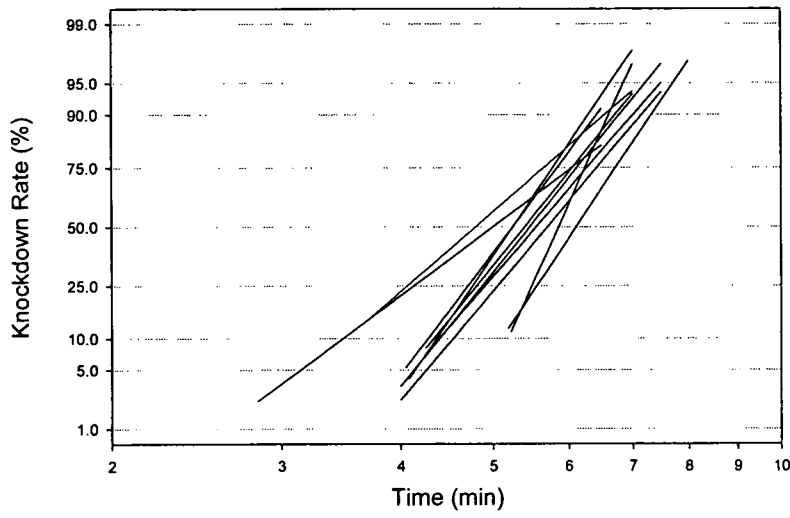


図2. オリセットネット継続接触試験

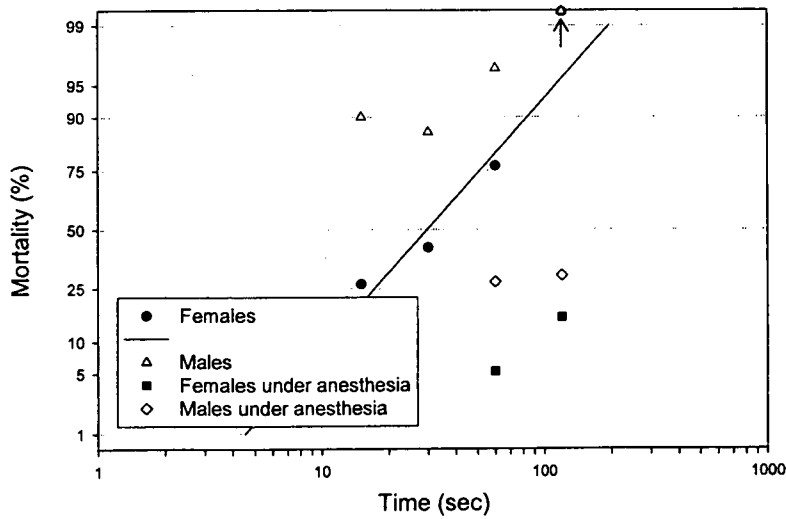


図3. オリセットネット限定時間接触試験

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

「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」

「新型インフルエンザウイルスの予防法・治療法の開発」

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

**研究要旨** 高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1) は本邦を含めたアジア諸国に広がり中東を経てヨーロッパ、アフリカまへの広がりを見せている。また、動物からヒトへの感染例も増え続けておりその致死率の高さからヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスへ発展したときの対応が急務である。本疾患のヒトでの感染の防御には効果的なワクチンの開発が急務である。本研究においては交叉防御能のある粘膜投与型インフルエンザワクチンの開発をおこないそのメカニズムの解明を行った。Natural Killer T 細胞を活性化することにより経鼻粘膜ワクチンの効果を強め、皮下接種と比較する事により粘膜ワクチンの利点を証明した。粘膜ワクチンはその感染防御能と交叉防御能に優れており新型インフルエンザの流行の防御の為に欠かせない。その粘膜免疫誘導の新しいメカニズムとして、粘膜局所に関連したリンパ装置での CXCL16 と IL-4 の関与が明らかとなった。

**A. 研究目的**

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパ、アフリカにまで広がりヒトに感染した場合に高い致死率をしめしている。本ウイルスがヒトからヒトへ伝播する新型インフルエンザの元となると危惧される新型インフルエンザ出現の脅威となっている。現在アジアを発端として流行している高病原性鳥インフルエンザの哺乳類での病原性を解析しその有効な予防法を開発しそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

**B. 研究方法**

**材料と方法：**

**ウイルス株及びワクチン株**

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 A/VN/1194/2004 及び A/Kyoto を用いてマウス感染実験を行った。また交叉防御の実験では A/PR8 (H1N1) のスプリットワクチンを用いた。H5N1 のワクチン株としてはリバースジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1) の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

**ウイルス感染**

A/VN/1194/2004 株ウイルスを 1,000pfu 及

び 10,000pfu を鼻腔内に接種した。交叉防御の実験においては A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N1), B/Ibaraki ウイルスを 1000pfu を経鼻接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL2 及び BSL3 動物実験施設でおこなった。

**アジュバントの調整**

経鼻粘膜ワクチンのアジュバントとして Natural Killer T 細胞のリガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を用いた。

**マウス**

免疫実験及び感染実験に用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウス (メス) 及び NKT 細胞欠損の J $\alpha$ 281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用いた。

**免疫方法**

7 週齢の BALB/c マウス (雌) を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 0.1~1  $\mu$ g のワクチンを 0.1~10  $\mu$ g の  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) アジュバント、と共に経鼻投与した。4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織 (NALT) および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。すべての動物実験は国立感染症研究

所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

## ELISA アッセイ

遺伝子を改変した H5HA 及び H1HA に対する IgA および IgG 抗体価の測定は、ELISA にておこなった。免疫に用いたワクチン抗原を ELISA プレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgA ( $\alpha$ 鎖) または IgG ( $\gamma$ 鎖) を反応させた。アルカリホスファターゼーストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ吸光度を測定した。あらかじめ精製した H5-HA, H1-HA 反応性の IgA と IgG を任意の単位 (160U) のスタンダードとして用い、2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

## 結果

### 1. $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) 併用経鼻ワクチンによる免疫応答

Natural Killer T (NKT) 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer をアジュバントに用いたインフルエンザワクチンについてその免疫応答を調べた。またそのアジュバント作用の特異性を調べる為にマウスは野生株の BALB/c マウスと NKT 細胞欠損の J・281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用い毒素系アジュバントのコレラトキシン B サブユニット (CTB) と比較した。ワクチンとアジュバントを 2 週間間隔で 2 回経鼻接種しその後の鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA 抗体濃度及び血清中の IgG 抗体濃度、チャレンジ後の鼻腔洗浄液中のウイルス価を図 1 に示す。野性株マウス及び J・281 遺伝子欠損マウスにおいては A/PR8 ワクチンと溶媒 (vehicle) のみを経鼻接種した群においては鼻腔洗浄液中の IgA 抗体及び血清中の IgG 抗体は認められず、感染後のウイルス価は  $10^3$  PFU/ml 以上認められた。一方  $\alpha$ -GalCer をアジュバントに用いた時野性株マウスでは鼻腔洗浄液中に PR-8 特異的分泌型 IgA 抗体および血中に IgG 抗体が誘導され攻撃感染後のウイルス価が有意に減少したが J $\alpha$ 281 遺伝子欠損マウスにおいては抗体応答は全く認められず攻撃感染後のウイルス価は  $10^3$  PFU/ml 以上であった。CTB\* をアジュバントに用いた群では共に抗体応答と感染防御が認められた。

### 2. $\alpha$ -GalCer 併用インフルエンザワクチン接種ルートによる相違と交叉防御

$\alpha$ -GalCer をアジュバントに用いたイン

フルエンザワクチンの接種による抗体応答とその防御能力について経鼻接種と筋肉内接種で比較した。図 2 に示すごとくワクチンとして A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki のスプリットワクチンをもちい接種ルートとしては経鼻と筋肉内接種を行い比較した。ワクチン  $1 \mu\text{g}$  と  $\alpha$ -GalCer  $2 \mu\text{g}$  を 3 週間おきに 2 回接種し、最終免疫より 2 週間後に A/PR8 (H1N1) インフルエンザウイルスを感染させ防御効果及び A/PR8 (H1N1) に反応する鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA 抗体価、血中の IgG 価の測定を行った。攻撃感染を行った A/PR8 (H1N1) ウイルスと同じ亜型に属する A/Yamagata (H1N1)、および亜型の異なる A/Guizhou (H3N2) のワクチンを用いて経鼻接種した時に鼻腔洗浄液中に A/PR8 (H1N1) に交叉反応する分泌型 IgA が有意に上昇した。それらは筋肉内接種群ではまったく認められなかった。また攻撃感染に対し経鼻接種群では同じ亜型である A/Yamagata (H1N1) のワクチン接種群では体重減少も見られず 100% の生存率であった。亜型の異なる A/Guizhou (H3N2) ワクチンを接種した群では体重減少が認められ生存率は 40% であった。B/Ibaraki ワクチン接種群、非免疫群では全てのマウスが死亡した。一方筋肉内接種群では同じ亜型の A/Yamagata (H1N1) ワクチンでも生存率が 20% であり A/Guizhou (H3N2) ワクチンでは 0% であった。このように同じワクチンを使用しているにもかかわらず接種ルートによりその交叉防御能は大きく異なった。経鼻接種では同じ亜型内では抗原性の異なる株でも交叉防御が可能であり、亜型が異なっても A 型内であれば部分防御が可能であることが示された。しかし筋肉内接種では同じ亜型内であっても交叉防御がほとんど認められなかった。 $\alpha$ -GalCer アジュバント併用による経鼻ルートでのインフルエンザワクチンの交叉防御能について更に解析を行う為に A/PR8 (H1N1) ワクチンを  $\alpha$ -GalCer と共に経鼻接種し最終免疫から 2 週間後に A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki のそれぞれのウイルスで攻撃感染を行なった。A/PR8 ワクチンと  $\alpha$ -GalCer アジュバントの経鼻接種後にそれぞれのウイルスに対する HI 価を測定したところ A/PR8 に対しては 1280、A/Yamagata (H1N1) に対して 320、それ以外のウイルスは共に検出感度以下であった。同じ亜型である A/Yamagata (H1N1) ウイル



スは攻撃感染後3日目の鼻腔洗浄液中には検出されず、亜型の異なるインフルエンザ A? Guizhou (H3N2) ウイルスは有意にウイルス価が減少した。これらの交叉防御能は B/Ibaraki 株では認められなかった。

### 3. $\alpha$ -GalCer アジュバントの作用機序に関連するサイトカイン

$\alpha$ -GalCer による粘膜アジュバント作用がサイトカインの産生に依存するかを調べる目的で IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  の遺伝子欠損マウスを用いインフルエンザワクチンを  $\alpha$ -GalCer アジュバントと共に経鼻接種しその免疫応答及び感染防御能について調べた。結果野生株マウスと比較し IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  遺伝子欠損マウスではいずれのマウスでも鼻腔洗浄液中の IgA 抗体価が低く、IL-4 欠損マウスにおいては血清中の IgG 抗体価も著しく低かった。攻撃感染後の感染防御能を調べると IgA, IgG 産生が共に低下した IL-4 遺伝子欠損マウスでは生存率が低下し感染防御効果が著しく低下した事が示唆された。このように  $\alpha$ -GalCer アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの作用機序には IL-4 遺伝子が深く関わっている事が明らかとなった。高病原性鳥インフルエンザウイルスによる感染を防御する目的でアジュバント併用経鼻不活化ワクチンによる感染防御を試みた。ワクチンとしてリバースジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1) の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを用いた。アジュバントには  $\alpha$ -GalCer を用いた。ワクチン接種後に A/Vietnam/H5N1 及び A/Kyoto/H5N1 による感染実験を行った。図5に示す如く、ワクチン非接種群では A/Vietnam/H5N1 攻撃感染で12日までにマウスは死亡したが、ワクチン接種群では100%生存した。一方、鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスである A/Kyoto/H5N1 株の感染ではワクチンの接種、非接種にかかわらずマウスは死亡しなかった。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル3病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

### D. 考察

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染予防を目指し、自然免疫の誘導による感染予

防と Natural Killer T (NKT) 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer をアジュバントに用いた経鼻ワクチンによる感染防御の研究を行った。Natural killer T (NKT) 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 IgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導され交叉防御能が確認された。その免疫応答と感染防御について皮下接種と様々なワクチン株と感染株を用いて比較したところ皮下接種群においては同じ亜型内の A/PR8 と A/Yamagata 間でも抗体の交叉応答及び交叉防御がみられなかった。一方経鼻接種においては両株間で100%の生存を示す感染防御がそれぞれの株のワクチンを用いた感染実験で示された。この粘膜免疫誘導による交叉防御は株の予測が不可能な新型インフルエンザの防御においてはその重要性がさらに増す。またこのような交叉防御を誘導する為にアジュバントとして  $\alpha$ -GalCer を用いているが、その作用機序に局所での NKT 細胞の活性化とそれに伴ったサイトカインの発現として IL-4 が重要である事が IL-4 遺伝子欠損マウスを用いた実験で明らかとなった。今後は IL-4 の作用を高める方法を検討する事によりさらに効果の高いアジュバントの開発が期待される。

### E. 結論

Natural Killer T 細胞のリガンドで活性化物質である  $\alpha$ -GalCer を粘膜アジュバントに用い高い交叉防御能のある新しいインフルエンザワクチン接種法が示された。本ワクチンによる感染防御メカニズムにはサイトカインである IL-4 が重要な働きをする事が示された。ワクチンの経鼻投与による粘膜免疫誘導が特に株の予測が困難な新型インフルエンザ対策としてその交叉防御の観点から有効である事が示された。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

1. Hasegawa H\*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T  
Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. Expert Review of Vaccines, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
2. 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 (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. J Med Virol. 2007 Jun;79(6):811-819

3. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H\* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.

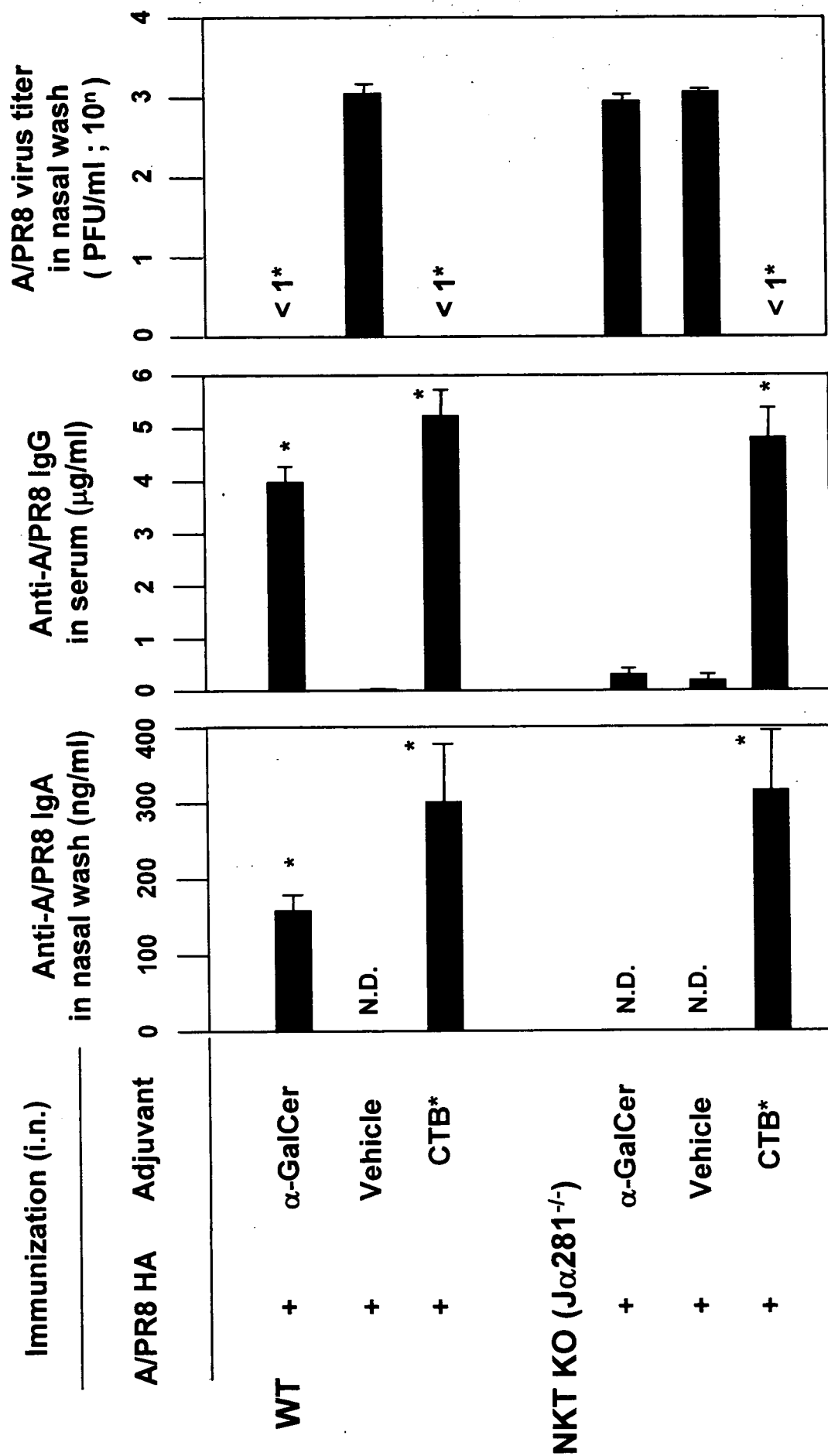
#### 学会発表

1. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology 21th-25<sup>th</sup> May 2008 Hakone
2. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)

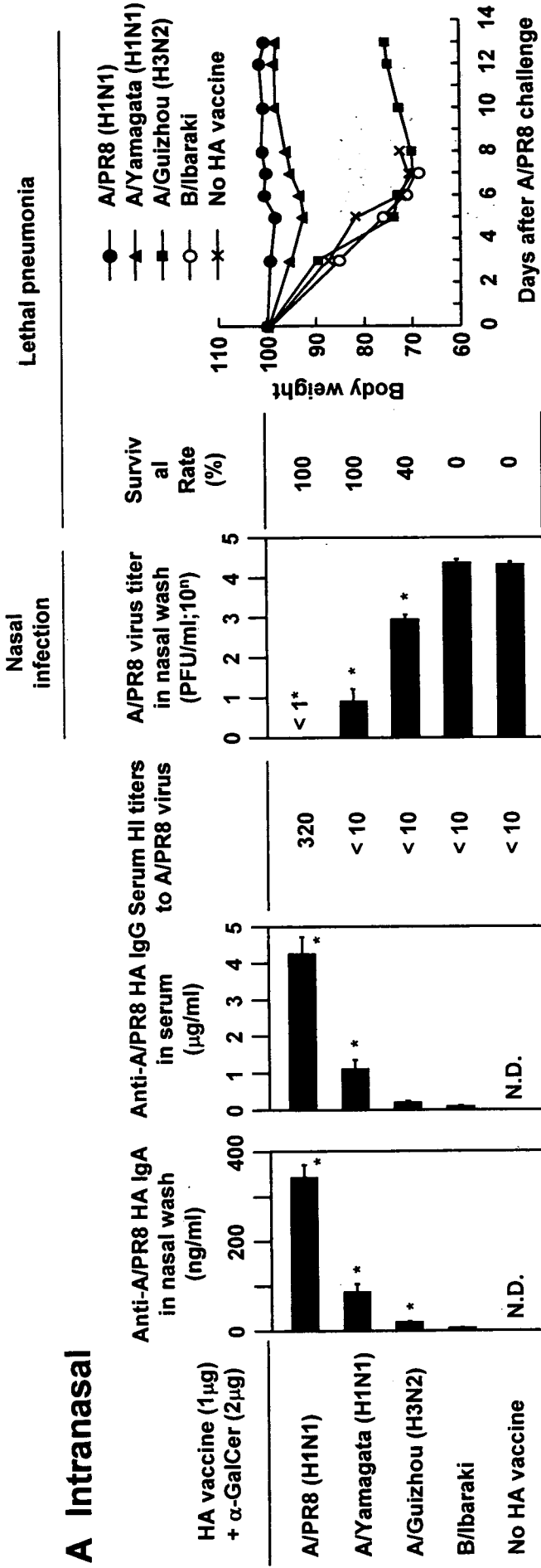
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)  
なし
2. 実用新案登録  
なし

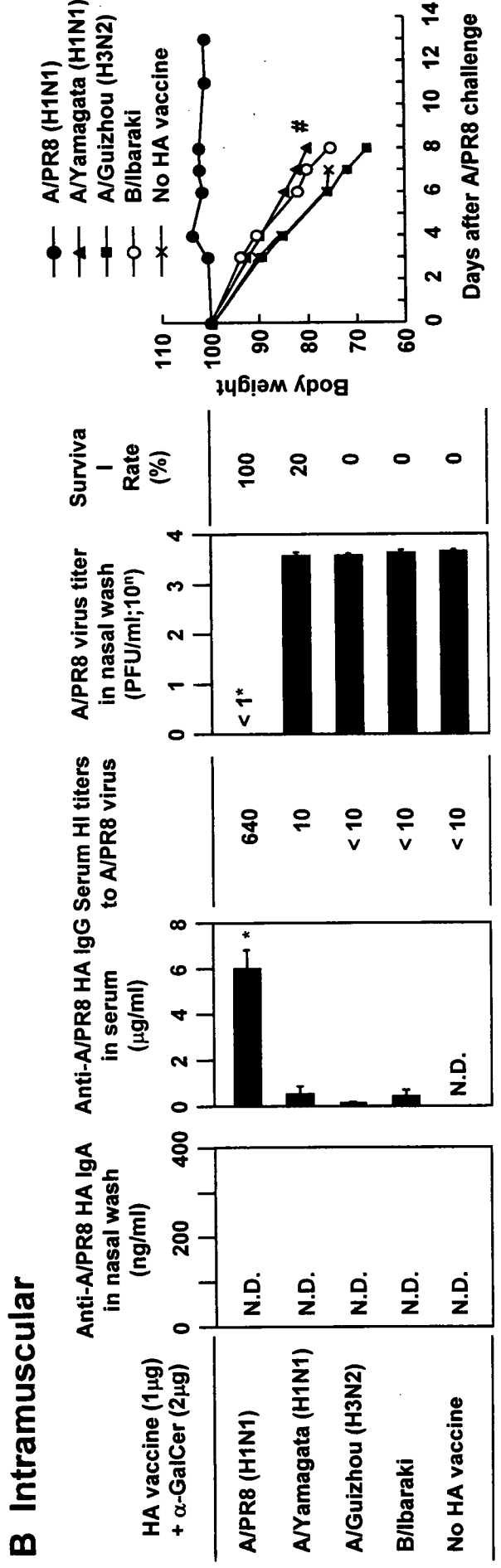
図1



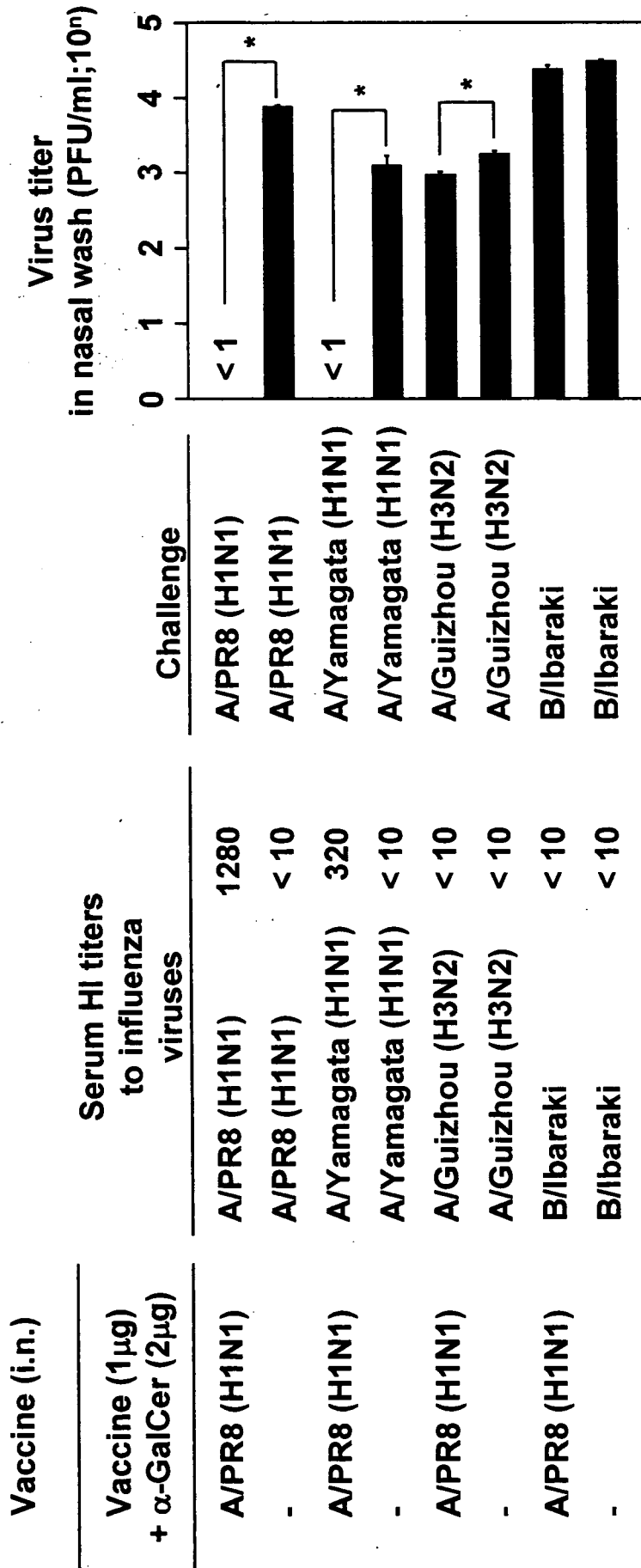
### A Intranasal

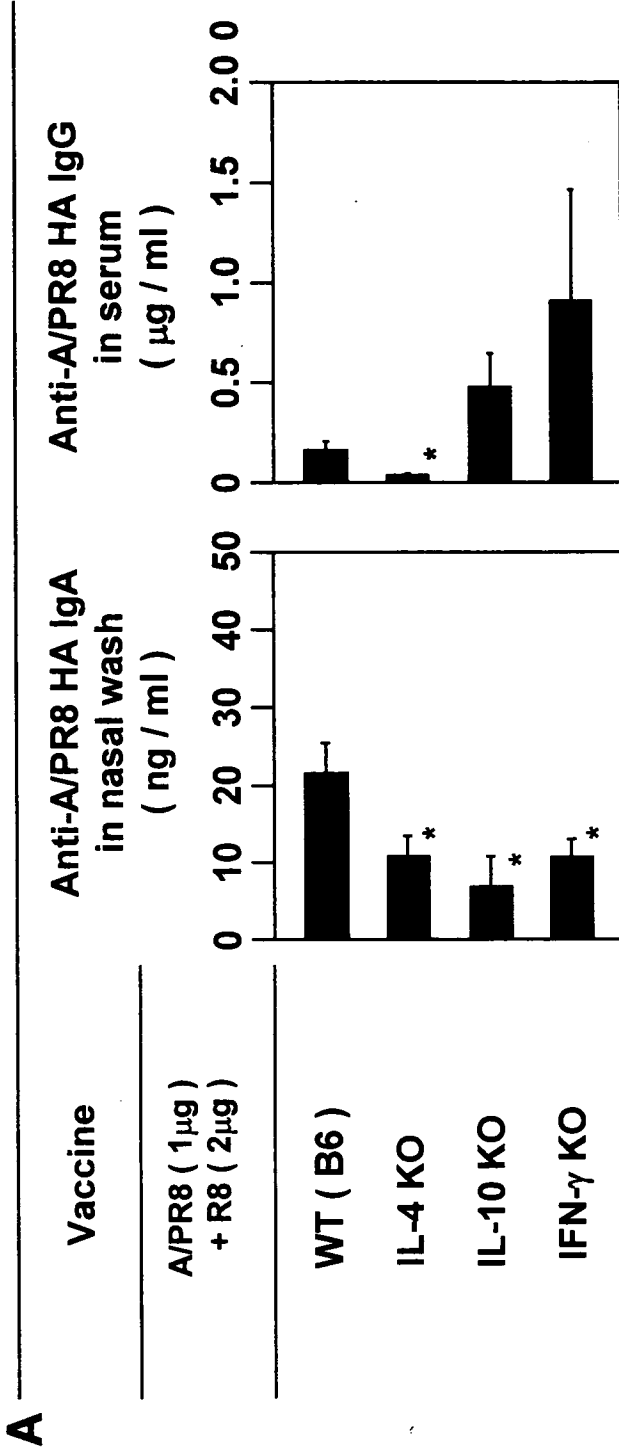


### B Intramuscular

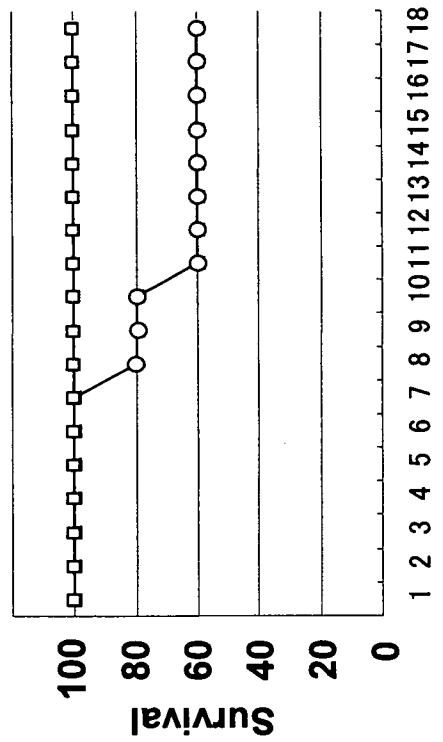


3

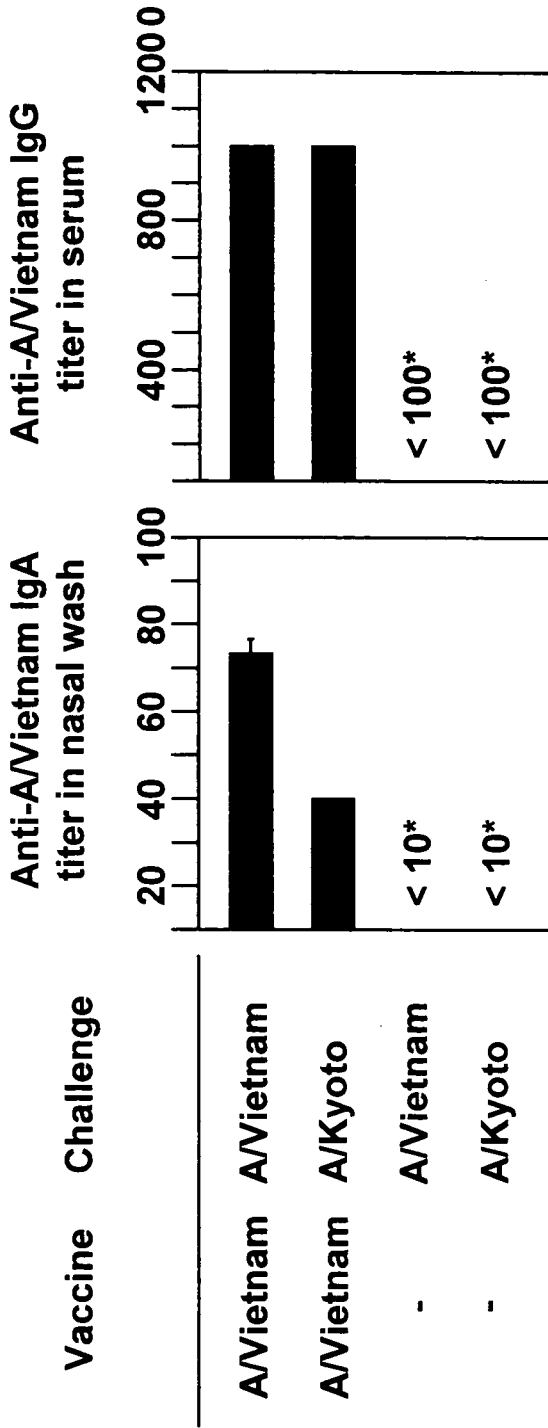




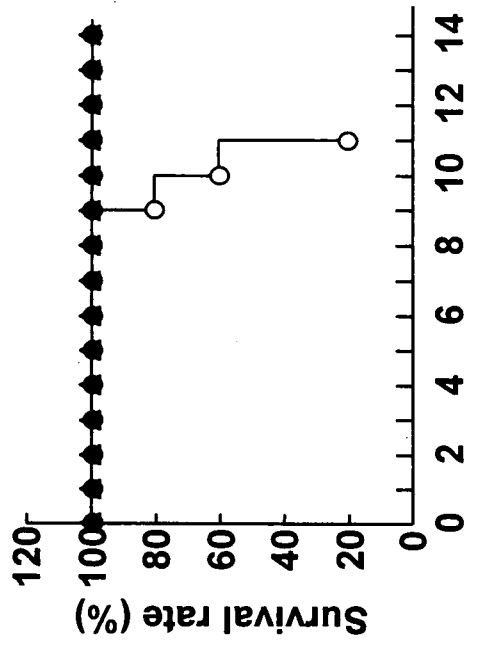
**B** ● WT ( B6 ) ○ IL-4 KO □ IFN- $\gamma$  KO



A



B



平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害剤（NAI）耐性株サーベイランス系の構築と  
耐性株の性状解析に関する研究

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

協力研究者：氏家誠、小淵正次、影山努、島袋梢、望月菊

国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室

堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲

製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部ゲノム解析部門

川上千春

横浜市衛生研究所

**研究要旨** 我が国では、2001 年にインフルエンザの治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬(NAI)の zanamivir 及び oseltamivir が認可されたが、現在では全世界の生産量の 50～70% を使用している。NAI 使用量の増加に伴い耐性株の出現が懸念される中、2007 年 11 月以降から EU 諸国で高頻度（20%以上）に耐性株が分離され、世界的な流行の兆しを見せている。このため、全世界的な NAI 耐性株サーベイランスの強化と重要性が高まっており、我が国でも NAI 耐性株サーベイランスの整備と構築が急務となった。本研究では、我が国の NAI 耐性株サーベイランス系の確立を目的に、市中分離株の薬剤感受性の測定と NA 遺伝子解析とを迅速に行う系を構築した。この系を用いて、2007/2008 シーズンの市中分離株に対する性状解析を行った。

#### A. 研究目的

我が国では 2001 年にインフルエンザ治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬(NAI)の oseltamivir 及び zanamivir が販売認可を受けて以来、oseltamivir 阻害薬の臨床での使用量は全世界の生産量の 50～70% を占め、世界第一位の使用量となっている。NAI 使用量の増加に伴い耐性株の出現が懸念されるが、oseltamivir を用いた臨床試験の成績において、成人で 0.4%、小児でも 4%前後と比較的低い耐性株の出現頻度が報告されている (Treanor et al., JAMA 283:2000)。Oseltamivir の治療を受けた 3 歳以下の小児では 18%と高頻度の耐性株検出頻度が報告されて

いるが、年齢的にインフルエンザ初期感染であった可能性が高く、免疫がないためウイルスが大量に増殖し耐性株が出現しやすい体内環境であったと考えられた(Kiso et al., Lancet 364:2004)。このため、NAI による耐性株の出現頻度は、別の作用機序をもつ抗インフルエンザ薬のアマンタジン(A/H1N1 = 約 18%、A/H3N2 =>90%)に比べかなり低頻度であると考えられてきた。ところが、2007 年 11 月以降から、A/H1N1 ウイルス NA 蛋白に H275Y 耐性マーカを持つ oseltamivir 耐性株が、ノルウエーの 64%を筆頭に EU 諸国全体でも全分離株の 20%以上を占めるようになった。これらの耐性株は oseltamivir を使用し



ていない患者から分離されていることから、自然発生的な耐性変異株である。これまで、oseltamivir 耐性株はヒトからヒトへの感染効率は低いといわれてきたが、今回 EU 諸国で流行している耐性株は通常のインフルエンザウイルスと同様の感染効率を持つことが分かっている。複数の国にまたがって、これほど高頻度で oseltamivir 耐性株が分離された例はこれまでになく、oseltamivir 耐性株の世界的な拡大が懸念されている。このため、WHO グローバルインフルエンザサーベイランスネットワークでは、全世界的な NAI 耐性株サーベイランスを強化し、各国における耐性株出現頻度と耐性株の性状について週単位で報告するように要請している。

我が国の NAI 耐性株サーベイランスの取り組みは、主に WHO の Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN) との共同研究として、2002/03 シーズンから開始されており、国内市中分離株は NISN の検査協力機関である ViroMed 社によって薬剤感受性の測定が行われ、このうち薬剤耐性を示した分離株に対して国立感染症研究所（感染研）で NA 遺伝子の解析を行い耐性株の同定を行ってきた(Monto et al., AAC 50:2006, WHO Weekly Epidemiological Report 82:2007)。この方法は、一定の期間ごとに収集した分離株についてまとめて測定を行うため、リアルタイムで耐性株の検出を捉えることは困難であった。また、2005/2006 シーズン以降は NISN とは別に耐性株サーベイランスが行われ、NA 遺伝子解析を基にした既知の耐性マーカを検出することで実施されてきた。この方法は、未知の耐性マーカをもつ耐性株が出現した際は、見逃してしまうという大きな問題点があった。このため、NAI 存在下でウイルス NA 活性を測定するバイオアッセイを NA 遺伝子解析と並行して実施する必要が出てきた。

本研究では、我が国の NAI 耐性株サーベイランス系の確立を目的に、市中分離株の薬剤感受性の測定

と NA 遺伝子解析とを迅速に行う系を構築した。これらの系を用いて 2007/2008 シーズンの市中分離株について性状解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 2006/2007 シーズン分離株

全国地方衛生研究所（地衛研）及び周辺アジア諸国で 2006/2007 シーズンに分離され、感染研に分与された A/H1N1 型(98 株)、A/H3N2 型(204 株)、B(143 株)について NITE と共同で NA 遺伝子解析を行い、既知の耐性マーカをもとに耐性株の同定を行った。

### 2. 2007/2008 シーズン分離株

地衛研及び周辺アジア諸国で 2007/2008 シーズン(2008 年 2 月 20 日現在)に分離され、感染研に分与された A/H1N1 型(102 株)、A/H3N2 型(31 株)、B(6 株)について、zanamivir 及び oseltamivir 存在下、NA-star(Applied Biosystem 社)を用いた NA 酵素活性の測定を行った。50%NA 酵素活性阻害濃度(IC50)は MikroWin 計算ソフトにより算出した。IC50 値の 25-75%が存在する幅を interquartile range(IQR)と呼び、その下限及び上限から  $5 \times \text{IQR}$  異なる値を示したものを限外値と呼ぶが、そのような値を示したものに関して優先的に NA 遺伝子の解析を行った。その他の株は NITE と共同で NA 遺伝子解析を行い、これらの情報をもとに耐性株の同定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 2006/2007 シーズン分離株

NA 遺伝子のアミノ酸配列にもとづく分析の結果、当該シーズンに分離された株に既知の耐性マーカを持つ株は検出されなかった(表 1)

表1. 2006/2007シーズン分離株のNAシーケンス要約

ウイルス型/亜型	解析数	ウイルス分離国		NAシーケンス要約	
				耐性マーカー*	耐性株数/解析総数
N1NA	98	解析株/分離株総数(国内)	55 / 579 (9.7%)	Y155H	0/98
			中国	34	G248R, I266V
		モンゴル	6	H274Y	0/98
		台湾	3		
N2NA	204	解析株/分離株総数(国内)	134/2287 (5.8%)	E41G	0/204
			中国	36	E119V
		韓国	28	Q226I	0/204
		台湾	4	R292K	0/204
		モンゴル	2	N294S	0/204
BNA	143	解析株/分離株総数(国内)	119/1987 (6.0%)	R152K	0/143
			中国	3	D198E
		韓国	4	D198N	0/143
		台湾	9	I222T	0/143
		モンゴル	8	S250G	0/143

\*N2 numbering  
\*\* 9 株に G248R アミノ酸置換あり

2. 2007/2008 シーズン分離株

・インフルエンザウイルス薬剤感受性の測定 (NAI assay) 系の構築

インフルエンザウイルスの薬剤感受性の測定は、段階希釈した NAI 存在下、ウイルスの NA 活性を測定し IC50 を算出することで行われる。NA 活性測定は、使用する基質により蛍光発光法と化学発光法に大別されるが、再現性・簡便性・感受性の面で化学発光法のほうが優れている事が報告されている (Wetherall et al., JCA 41. 2003.)。よって、感染研でも NA-star (Applied Biosystem 社) を酵素基質として用いた化学発光法を採用した。測定法の妥当性を評価

して既知の耐性マーカー(H275Y)を持つ A/北九州/10/2006(H1N1)と、Zanamivir に対して既知の耐性マーカー(H155Y)をもつ A/北海道/15/2002(H1N1)を用い、陰性コントロールとしてそれぞれに対応する感受性株を用いて各株の IC50 値の測定を行った。この結果、これらの耐性株は、薬剤感受性株と比べ、明らかな IC50 値の増加が認められ、かつ IC50 値に高い再現性が得られた(表 2)。その他、代表的な耐性マーカー-E119V(H3N2)、R292K(H3N2)、R152K(B)を持つ耐性株を用いて IC50 値を測定したところ全ての耐性株で明らかな IC50 値の増加が認められた。このことから、感染研で確立した NAI assay 系は既知の耐性株を容易に検出する事が可能であると判断した。

表2. 既知耐性マーカーを持つ耐性株のIC50値測定結果

ウイルス	耐性マーカー	IC50値	
		Oseltamivir	Zanamivir
A/北九州/10/2006 (H1N1)	Y275 (耐性株)	153.33 ± 34.90	0.48 ± 0.03
A/山口/20/2006 (H1N1)	H275 (感受性株)	0.38 ± 0.09	0.65 ± 0.14
A/北海道/15/2002 (H1N1)	Y155 (耐性株)	4.29 ± 0.25	56.90 ± 14.97
A/北海道/9/2002 (H1N1)	H155 (感受性株)	0.15 ± 0.01	0.34 ± 0.12

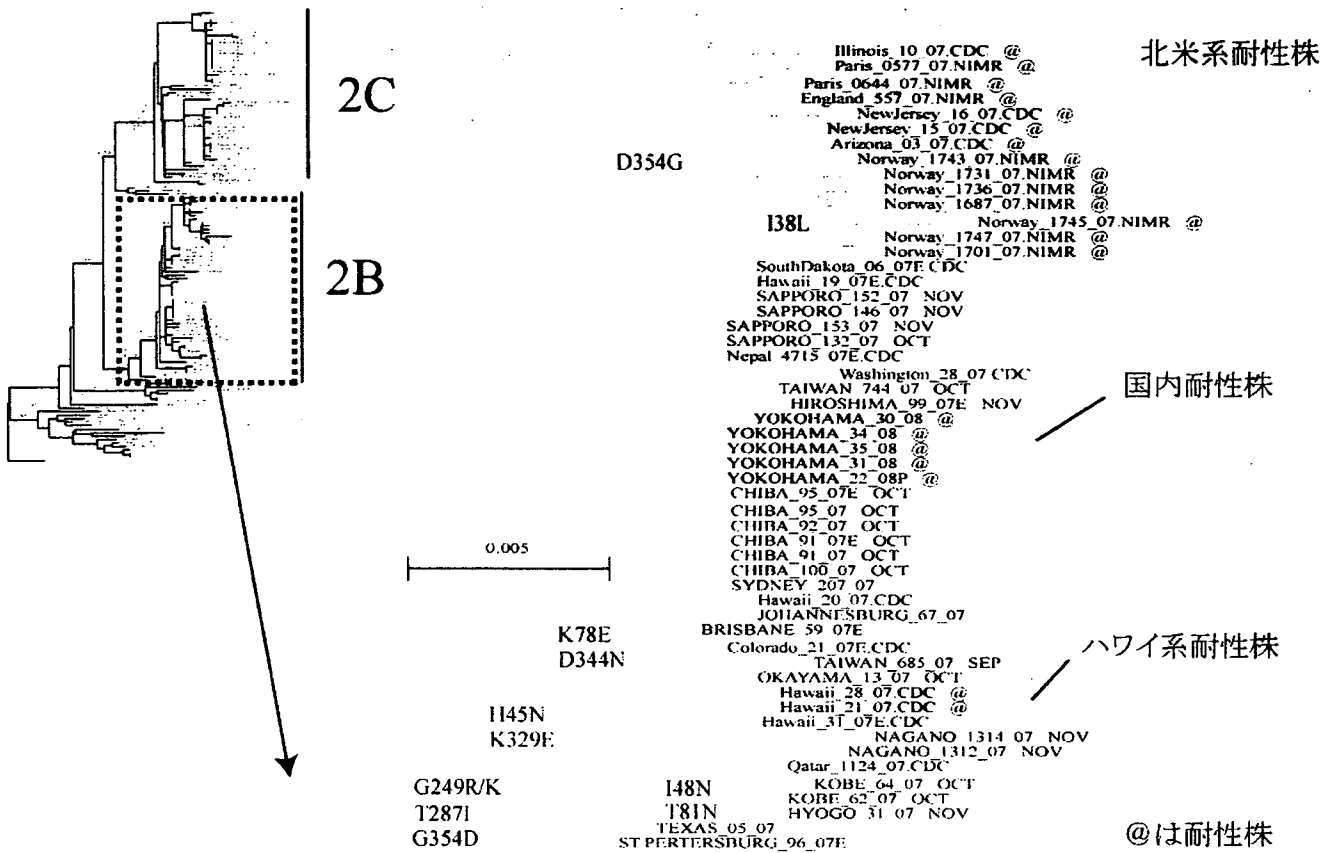
・市中分離株からの迅速な薬剤耐性株の同定  
市中分離株から迅速に耐性株を同定するために、地衛研から分与され感染研で増殖した分離株は、最初に NAI assay を行い、IC50 値が限外値を越えるものを優先して NA 遺伝子解析を行った。この方法によ

表3. 2007/2008シーズン分離株のNAIアッセイとNAシーケンス要約

ウイルス型/亜型	解析数	ウイルス分離国		NAIアッセイ			IC50値			NAシーケンス要約		
				解析数	zanamivir	Oseltamivir	解析数	zanamivir (中央値)	Oseltamivir (中央値)	解析数	耐性マーカー*	耐性株数/解析総数
N1NA	102	解析株/分離株総数(国内)	100 / 1749 (5.7%)	99	0/99	2/99**	99	0.22	0.09	76	Y155H	0/76
			中国								1	G248R, I266V
		台湾	1								H274Y	5/76**
N2NA	31	解析株/分離株総数(国内)	18 / 96 (18.8%)	31	0/31	0/31	31	1.82	0.11	29	E41G	0/29
			台湾								13	E119V
											Q226I	0/29
BNA	6	解析株/分離株総数(国内)	4 / 18 (22.2%)	6	0/6	0/6	6	0.83	3.56	6	R292K	0/29
			中国								1	N294S
		台湾	1								R152K	0/6
											D198E	0/6
											D198N	0/6
											I222T	0/6
		S250G	0/6									
		G402S	0/6									

\*N2 numbering  
\*\* NAシーケンスでH274Yを確認した5株のうち2株をNAIアッセイした。3株は未解析

するため陽性コントロールとして、Oseltamivir に対し、分離株を増殖してから 1~2 週間以内に耐性株



ウイルス	耐性マーカー	IC50値	
		Oseltamivir	Zanamivir
A/横浜/34/2008 (H1N1)	Y275 (耐性株)	33.29 (107倍)*	0.38 (0.73倍)
A/横浜/35/2008 (H1N1)	Y275 (耐性株)	37.37 (120倍)	0.46 (0.88倍)

\* 同時に測定した陰性コントロールのIC50値を1.0としたときの倍率

図 1: 国内耐性株の系統樹解析と IC50 値測定結果

の同定が可能となり、市中分離株の迅速なモニターが可能となった。

・2007/2008 シーズンの解析結果

NAI assay 及び NA 遺伝子のアミノ酸配列にもとづく分析の結果、当該シーズン(2008年2月20日現在)に分離された株について、H1N1 は 102 株中 5 株(4.9%)、H3N2 は 31 株中 0 株(0%)、B 型は 6 株中 0 株(0%)の耐性株が見つかった。H1N1 の 5 株の耐性株は既知の耐性マーカーの H275Y を持っていた(表

3)。

・国内分離 H1N1 耐性株の性状解析

現在流行中の A/H1N1 株は NA 遺伝子系統樹上で 2B(G249R/K、T287I、G354D)または 2C(S82P、M188I、D344N、L367I、V393I、T453I)の 2 つのサブクレードのどちらかに属すが、H275Y をもつ耐性株は国内分離株・海外分離株共に全て 2B に属する(図 1)。一方、2B 内では、北欧で流行している耐性株(D354G)とは異なるクラスターを形成しており、国内耐性株

は大もとのウイルスが北欧系ウイルスと少し異なる  
と考えられる。また、5株の耐性株のうち2株につ  
いて感受性株と IC50 値を比較したところ、  
Oseltamivir に対して 100 倍以上の増加が認められた。  
一方、Zanamivir に対しては感受性株と同様の値であ  
った。

#### D. 考察

本研究により、我が国の NAI サーベイランス系の基  
礎が確立された。しかしながら、更なる改善のため  
取り組むべき課題も残っている。1) アッセイ系の問  
題：NAI assay は採用する NA 酵素活性測定法、使用  
する IC50 値算出ソフトによって、同一サンプルでも  
IC50 値が大きく変わる事が知られている(Wetherall  
et al., JCA 41, 2003)。そのため、各機関で個別の IC50  
値が算出されたとしても、その値を一概に比較する  
事ができない。この問題を解決するために、参照株  
として使用する耐性株を選定し各機関で統一化をは  
かる必要がある。2) 迅速化の問題：現在の我が国の  
株サーベイランスでは地衛研の分離株の情報を受け  
て、感染研がそれらの株の分与依頼をする。そのた  
め、地衛研がウイルスを分離してから、感染研がそ  
の分離株を受け取るまでに 1 ヶ月以上のタイムラグ  
が生じる。従って、更なる迅速化には、分離株の分  
与に伴うタイムラグを出来るだけ短縮する必要がある。  
一方、今回の横浜市衛生研究所の協力に見られ  
るように、地衛研で NA 遺伝子の解析を行う事によ  
り、迅速な耐性株の同定が可能であった。このこと  
から、今後は地衛研を含んだ国内の NAI サーベ  
ランスネットワークの構築も必要である。3) 耐性株は、  
感受性株と比べて IC50 値が 10 倍程度増加するもの  
から 1000 倍以上増加するものまで、耐性マーカーに  
依存して幅広い耐性度を示すため、全ての耐性株を  
同等に論じるのは問題がある。今後も新たな耐性マ  
ーカーが同定される可能性があるが、臨床的に重要

な耐性株なのか感染性・増殖性・動物内での薬剤感  
受性など詳細な解析を行い、慎重な見極めが必要で  
ある。

#### E. 結論

本研究で我が国の NAI 耐性株サーベイランス系が確  
立できた。この系を用いる事で、今後は、市中分離  
株の耐性株出現を迅速にモニターする事が可能とな  
った。

#### F. 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.