

【研究方法】

2007-08 のインフルエンザウイルス流行時期に、仙台市内近郊の 17 の小児科開業施設にインフルエンザ様症状にて受診した小児を対象とした。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し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。インフルエンザウイルスの分離は赤血球凝集阻止試験にて確認した。対象患者より、性別、月齢、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を収集した。

【結果】

仙台市内にてインフルエンザが流行した 2008 年 1 月からの 2 ヶ月間に、咽頭および鼻腔内ぬぐい液 409 検体、便 402 検体、合計 811 検体が提出

された。咽頭および鼻腔内ぬぐい液より、インフルエンザウイルス A(H1)213 株、インフルエンザウイルス A(H3) 4 株、インフルエンザウイルス B(山形系) 8 株、インフルエンザウイルス C 型が 2 株分離され、便からは 2 2 株のインフルエンザウイルス A(H1)が分離された。

【考察】

インフルエンザ様症状を呈した小児の便よりインフルエンザウイルスが分離された。実験室内でのコンタミネーションを否定するため、保存検体からの再分離、real time PCR による検体中にウイルス量の定量を行う予定である。また、どのような要因が便中にウイルスを排泄するのか、患者情報と照らし合わせる予定である。

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>
- Oshitani H, Kamigaki T, Suzuki A. Influenza pandemic preparedness in developing countries: major issues and challenges. *Emerg Infect Dis* 2008 In press

【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)
- 押谷仁. 【ウイルス感染症】新型インフルエンザによるパンデミック. 分子呼吸器病. 2007. 11:19-24
- 押谷仁. 鳥インフルエンザ(H5N1)感染症の現状と今後. 日本内科学会雑誌. 2007. 96:1987-1992
- 押谷仁. 【インフルエンザを取り巻く治療・予防の現状と課題】新型インフルエンザ出現の時期と出現後の対応(日本、海外). *Progress in Medicine.* 2007. 27:2307-2312
- 押谷仁. 【難敵ウイルスを知る——感染拡大防止に備えて】インフルエンザの治療と新型インフルエンザ対策. 月刊薬事. 2007. 49:1191-1195

- 押谷仁. 【新興・再興感染症の現状と予防】 高病原性トリインフルエンザと新型インフルエンザ. 保健の科学. 2007. 49:669-673
 - 押谷仁. 話題のウイルス 鳥インフルエンザ. Drug Delivery System. 2007. 22:578
 - 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雑誌. 2007. 47:52-54
 - 押谷仁. 鳥インフルエンザと新型インフルエンザ. Medical Technology. 2007. 35:57-61
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: 何がわかっているか? 何がわかっているのか? 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.
 - 押谷仁、第104回日本内科学会総会 教育講演「鳥インフルエンザ(H5N1)感染症の現状と今後」
 - 押谷仁、第55回日本化学療法学会総会 教育講演「日本の新型インフルエンザ対策の現状と課題」

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

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

インフルエンザウイルス分離用宿主の検討に関する研究

分担研究者 滝澤剛則（富山県衛生研究所 部長）

協力研究者 中村一哉、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、
倉田 毅（富山県衛生研究所）

研究要旨 新型インフルエンザウイルスを効率よく分離するには、複数の宿主が必要である。消化管への感染の可能性もあるため、消化器系の細胞も分離に効果的と考えられる。また、ノイラミニダーゼ（NA）阻害剤を汎用すると、NA 変異による耐性ウイルスの出現も懸念される。そこで、本研究では、消化器系の細胞として、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞をモデルとして、その感染様式を MDCK 細胞と比較検討した。また、変異 NA を持つウイルスを効率よく分離するために、宿主に NA を導入した細胞の作製を試みた。AH1 ウイルスは、Caco-2 細胞では MDCK 細胞に比して感染効率が低かったのに対して、AH3 ウイルスは、Caco-2 細胞にも MDCK 細胞と同等以上によく感染した。両細胞に $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸の染色性に大きな差は無いため、Caco-2 細胞において AH1、AH3 間で感染効率が異なるのは、ウイルス側に要因があることが推定された。一方、NA を恒常的に、あるいは誘導可能な形で発現する MDCK 細胞の作製を試み、複数の細胞を得た。

A. 研究目的

変異あるいは新型インフルエンザ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が人に感染した事例では、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 細胞でのインフルエンザウイルスの感染挙動を MDCK 細胞のそれと比較検討した。また、ノイラミニダーゼ阻害剤を汎用することにより、ノイラミニダーゼ（NA）変異による阻害剤耐性ウイルスの出現が懸念されている。このような NA 変異を持つウイルスを効率よく分離する宿主として、NA を発現する宿主を用意することは意義のあることと考えられる。NA を

MDCK 細胞に恒常的に導入すると、ウイルスの感染初期過程、あるいは細胞増殖に影響を及ぼす可能性が考えられたため、NA を恒常的、および誘導可能な形で発現することを試みた。

B. 研究方法

1) 細胞培養、およびウイルス感染

臨床分離株（AH1、AH3）を Caco-2 細胞、あるいは MDCK 細胞に感染させた。定時ごとに細胞、あるいは培養上清を集め、それぞれ感染細胞の染色、あるいはウイルス力価の測定を行った。

3) 免疫染色

カバーガラス上に培養した細胞にウイルスを感染し定時間培養後、4%パラフォルムアルデヒド（PFA）/0.1%Triton-X で固定した。固

定した細胞をヒト抗ウイルス血清、次いで FITC 標識抗ヒト IgG 抗体により染色した。レクチンを用いた $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸染色には、ロシュ社の DIG Glycan Differentiation kit を用いた。

4) ウェスタンブロット

定時ごとに細胞を溶解液により回収し、SDS-PAGE により分離した。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、ヒト抗ウイルス血清、次いで HRP 標識抗ヒト IgG 抗体中で室温に孵置した後、TMB キット (VECTOR 社) により染色した。

2) NA 発現 MDCK 細胞

WSN-NA を pcDNA、あるいは pTet-Off に導入した。得られたプラスミド DNA を、それぞれ MDCK 細胞、MDCK Tet-Off 細胞に導入し、G418、あるいはハイグロマイシン耐性細胞を選択した。なお、組み換え DNA 作製は、当研究所組換え DNA 実験安全管理規程に従った。

C. 研究結果

1) MDCK 細胞、および Caco-2 細胞における AH1 と AH3 ウイルスとの感染の比較

AH1 では、Caco-2 細胞への感染が MDCK 細胞に比較して非常に少なかったのに対して、AH3 では、Caco-2 細胞で感染効率が高い傾向を示した。(図 1)。

Caco-2 細胞を高度に分化させ、分化の指標であるドームへのインフルエンザウイルス感染を検討したところ、AH1 がドームにほとんど感染しなかったのに対して、AH3 はドームにもよく感染した。また、AH1 では、Caco-2 細胞の分化に伴い感染細胞数がさらに減少した。MDCK 細胞と Caco-2 細胞とでは、 $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸の染色性に大きな差は無く、ドームでは、いずれも強く染色される傾向を示した。

2) NA 発現 MDCK 細胞

MDCK 細胞に WSN-NA を恒常的、あるいは誘導可能な形で発現する細胞の作製を試み

た。MDCK 細胞に NA 発現プラスミドベクターを導入し、各マーカー薬剤耐性細胞を選択した。14 個の pcDNA-NA 導入細胞、および 2 個の pTet-Off-NA 導入細胞をそれぞれ分離した。予備実験では、AH3 ウイルスの感染効率は、NA 発現細胞ではコントロール細胞に比してやや低い傾向を示した。pTet-Off-NA 導入細胞は、テトラサイクリン除去による NA の発現誘導能を検討している。

D. 考察

AH1 ウイルスでは、Caco-2 細胞への感染効率が MDCK 細胞より低かったのに対して、AH3 ウイルスでは、Caco-2 細胞への感染効率は MDCK 細胞と同等以上だった。また、腸管系細胞への分化を示すドームにも、AH1 ウイルスはほとんど感染しなかったのに対して、AH3 ウイルスはよく感染した。レクチン染色では、いずれの細胞も $\alpha 2-6$ 、 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸の染色性に大きな差はないように見えたことから、AH1 と AH3 ウイルスの Caco-2 細胞への感染効率の違いは、ウイルス側に主な要因があると推定される。今後、これらのウイルスの各遺伝子分節の比較を行うことにより、腸管系細胞での増殖効率に関わるウイルス因子を明らかにできるものと期待される。

MDCK 細胞に NA を恒常的に発現させると、導入 NA のウイルス感染初期過程への影響、細胞増殖そのものへの影響などが予想されることから、ウイルス感染過程の任意の時期に NA を発現誘導できることが望ましいと考えられる。今後、選択した細胞での NA 発現レベル、ウイルス感染効率、変異 NA を持つウイルスの分離効率等をそれぞれ検討していく。

E. 結論

1. インフルエンザウイルス (AH1、AH3) を MDCK 細胞と、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞とを用いて感染様式を検討したところ、AH1 ウイルスは、MDCK 細胞に効率よく感染するのに対し

て、Caco-2 細胞では悪かった。AH3 ウイルスは、Caco-2 細胞にも MDCK 細胞と同等以上に効率よく感染した。

2. Caco-2 細胞で AH1、AH3 の間で感染効率が異なるのは、ウイルス側に要因があることが推定された。

3. ノイラミニダーゼを恒常的に、あるいは誘導可能な形で発現する MDCK 細胞の作製を試み、複数の細胞を得た。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、長谷川澄代、滝澤剛則、永井美之、田中桂子、朝野芳明、中澤保文、米道暁彦、宮田英喜：インフルエンザ流行予測調査、富山県衛生研究所年報、29、101-106、2006.

2. 富山県衛生研究所編集：インフルエンザ定点把握感染症、富山県感染症発生動向調査事業報告書、p16、2006.

3. 富山県衛生研究所編集：インフルエンザ、平成 17 年度感染症流行予測調査報告書、p35-43、2006.

4. Yumi Hashimoto, Takeshi Moki, Takenori Takizawa, Akiko Shiratsuchi, and Yoshinobu Nakanishi. Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *J. Immunol.* 178:2448-2457, 2007.

5. 堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、長谷川澄代、滝澤剛則、倉田 毅、田中桂子、南部厚子、中澤保文、田中有易知、上田順子、宮田英喜：インフルエンザ流行予測調査、富山県衛生研究所年報、

30、81-90、2007.

6. 富山県衛生研究所編集：インフルエンザ、平成 17 年度感染症流行予測調査報告書、p28-39、2007.

7. Yoshinobu Nakanishi¹, Yumi Hashimoto¹, Takenori Takizawa and Akiko Shiratsuchi
Mechanisms and Consequences of Phagocytosis of Influenza Virus-Infected Cells
Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (in press).

2. 学会発表

1. 堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、長谷川澄代、滝澤剛則、倉田 毅：過去4シーズンにおけるインフルエンザワクチン接種前後の抗体価のへんどうについて。第48回日本臨床ウイルス学会（富山）2007. 06. 02.

2. 滝澤剛則、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、中村一哉、倉田 毅：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。第55回日本ウイルス学会（札幌）2007. 10. 21.

H. 知的財産の出願・登録情報

なし