

340-350.

3. Global distribution of measles and rubella-update. 2006WER 81473-479.

4. Kreis S, et al. J Med Virol. 1998;56:174-7

5. Riddell MA, et al. J Clin Microbiol.

2001;39:375-6.

研究発表

1. 論文発表:無し

2. 学会発表:

- 鈴木陽他、第 82 回日本感染症学会(2008.4 月)
- A.Suzuki et al. 13th International Congress on Infectious Diseases (Malaysia, June 2008).
- 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

ヒト RS ウイルス（HRSV）の遺伝子進化

分担研究者： 鈴木 宏（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学分野）

共同研究者： Isolde Dapat, 菖蒲川由郷, 佐野康子, 鈴木康司, 熊木彬彦, Clyde Dapat,
Hassan Zaraket, 齋藤玲子

研究要旨

ヒト RS ウイルス（Human Respiratory Syncytial Virus: HRSV）には A と B の亜型があり、G 蛋白第 2 可変領域の変化に応じてさらに遺伝子型が分類される。HRSV は 2 歳までにはほとんど全ての小児が罹患するとされる。しかし、再感染は日常的であり、G 蛋白の変異を含むウイルスの遺伝子進化が関与すると考えられており、同部位の解析は HRSV の進化を考察する上で重要である。

2001-2008 年、新潟市の 1 小児科医院で HRSV 感染が疑われた 5 歳以下の小児から臨床検体を採取し、G 蛋白第 2 可変領域の樹形図解析を行い遺伝子進化を観察した。さらに、シーズン間の平均年齢の比較と再感染例の解析から遺伝子型の別と疫学的特徴の関連について検討した。

合計 566 件の HRSV を解析した。HRSV-A（A 型 HRSV）では 2003/2004 シーズンまでは遺伝子型 GA5 が優位であったが、2004/2005 シーズンに新たな遺伝子型である NA1、2005/2006 シーズンには NA2 が出現し、流行の首座となった。HRSV-B（B 型 HRSV）では 2002/2003 シーズンの BA 出現後、2007/2008 シーズンまでクラスターを形成しながら継続的に BA が流行した。NA1, NA2 の出現後、2005/2006、2006/2007 シーズンに大流行が起こったが、これは 2003 年 11 月に始まった HRSV の全国サーベイランスの傾向とも一致した。新しい遺伝子型 NA1, NA2 が出現したことにより、特に HRSV の過去の免疫をもっていて罹患しないか、ごく軽症で受診に至らない 2 歳以上の患児が多数感染することで流行が大きくなった可能性が示唆された。また、NA2 の平均年齢が高く、2 歳以上の割合が多く再感染例が多いことが示され、遺伝子型と疫学的特徴の関連が示唆された。

A. 研究目的

はじめに

ヒト RS ウイルス（Human Respiratory Syncytial Virus: HRSV）は乳幼児に深刻な下気道感染を引き起こすウイルスであり、2 歳までにはほとんどの小児が感染すると言われている。低出

生体重児や先天性心疾患、免疫不全状態の小児では重症化し、ときに死亡することがある。HRSV には A と B の 2 つの亜型があり、さらにそれぞれが G 蛋白の C 末端領域にある第 2 可変領域の変化に応じて遺伝子型別に分かれる。この G 蛋白の第 2 可変領域の分子疫学的解析は HRSV の進

化を理解する上で重要と考えられている。HRSV は、地域や、シーズンにより様々な遺伝子型が流行し、傾向やパターンが報告されているが詳細は明らかではない。また、遺伝子型の別による臨床的特徴や流行の特徴については今までのところ報告はない。

我々は、2001/2002 から 2007/2008 シーズンの計 7 シーズンの新潟市の 1 小児科医院受診患者における HRSV 流行のサーベイランスと分子疫学的解析を行い、遺伝子進化を観察した。さらに、遺伝子型と臨床的・疫学的特徴との関連についても検討した。

B. 研究方法

2001 年 11 月から 2008 年 4 月までに、新潟市の 1 小児科医院を喘鳴・咳・鼻汁・発熱などの急性下気道症状を来して来院した 5 歳以下の患児のうち HRSV 感染を疑った患児を対象として、鼻腔吸引液または鼻腔ぬぐい液を採取し、あわせて患者の臨床情報を聴取した。臨床検体より RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて RT 反応を行い cDNA を作成、HRSV-A、HRSV-B それぞれ特異的なプライマーを用いて PCR を行い亜型を判定した。さらに PCR により増幅した G 蛋白第 2 可変領域 270 塩基についてシークエンスにより塩基配列を決定した。Neighbor-joining 法による樹形図解析を行い、2001/2002 シーズンから 2007/2008 シーズンにおいて流行した HRSV の亜型・遺伝子型を解析し、年齢などの臨床情報に基づき遺伝子型との関連を検討した。さらに、期間中に認められた HRSV 再感染症例について遺伝子型のパターンを検討した。

C. 研究結果および考察

期間中計 1247 件の臨床検体を採取した。PCR により 566 件の HRSV 陽性検体を確認した。2001/2002 シーズンから 2004/2005 シーズンまでは HRSV 陽性検体は年回 33-75 件であったが 2005/2006、2006/2007 シーズンはそれぞれ 121

件、154 件と大きな流行を示した。この傾向は 2003 年 11 月に始まった HRSV 全国サーベイランス結果とも一致した (図 1)。

PCR の結果からは HRSV-A 352 件 (62.2%)、HRSV-B 214 件 (37.8%) であり、さらに樹形図解析により HRSV-A は GA5 が 124 件 (21.9%)、GA7 が 5 件 (0.9%) で、今回初めての報告となる NA1 は 78 件 (13.8%)、NA2 は 145 件 (25.6.7%) に分かれた (図 2)。HRSV-B は GB3 が 5 件 (0.9%)、SAB3 が 2 件 (0.4%)、2002/2003 シーズンに出現した 60 塩基の繰り返しが挿入された BA (プエノスアイレスタイプ) が 207 件 (36.6%) あった (図 2)。シーズン別には 2001/2002 シーズンは GA5 が優位 (30/33, 90.9%)、2002/2003 シーズンは BA が優位 (43/60, 71.7%)、2003/2004 シーズンは再び GA5 が優位 (67/75, 89.3%) であったが、2004/2005 シーズンに NA1 が出現し半数以上を占め (29/45, 64.4%)、同時に GA5 (7/45, 15.6%)、BA (8/45, 17.8%) も流行した。2005/2006 シーズンには NA2 が出現し約 1/3 を占め (40/121, 33.1%)、同時に NA1 (37/121, 30.6%)、BA (36/121, 29.8%) が流行した。2006/2007 シーズンには NA2 が流行の大部分を占め (100/154, 64.9%)、BA の流行も続いた (48/154, 31.2%)。2007/2008 シーズンは BA が優位 (64/78, 82.1%) であった。HRSV-A では 2001/2002 シーズンから 2003/2004 シーズンまで GA5 が継続的に流行したが、2004/2005 シーズンに NA1、2005/2006 シーズンに NA2 が出現し、流行の大部分を占め、2006/2007 シーズンには NA2 が大流行を起こした (図 3)。HRSV-B では 2002/2003 シーズンに BA が出現し、2007/2008 シーズンまで継続的に流行したが大流行は起こさなかった (図 3)。2005/2006、2006/2007 シーズンの規模の大きい流行は HRSV-A の新しい遺伝子型である NA1 と NA2 の出現が原因と考えられた。

シーズンごとの HRSV 陽性者の平均年齢を比較すると 2006/2007 シーズンで 1.8 ± 1.1 歳と高く、他シーズン ($0.8 \pm 0.6 \sim 1.4 \pm 0.8$ 歳) との比較においても有意に高かった。HRSV 陰性者では

平均年齢のシーズン間の差はなかった。2歳以上が占める割合を比較した結果、HRSV 陽性者では2006/2007シーズンで40.3%と有意に高く(他シーズンでは6.1~22.7%)、平均年齢が高くなった原因と考えられた。遺伝子型別の平均年齢の比較でもNA2が 1.7 ± 1.1 歳で他の遺伝子型の平均年齢より高かった(GA5の 1.0 ± 0.8 歳と比べ有意に高かった)。期間中、HRSVの再感染を起こした症例は39例(6.9%)あり、中でも2回目の感染の原因ウイルスはNA2が半数以上を占めた(20/39, 51.3%)。

今回、新しく報告したNA1, NA2はGA2近縁株で、NA1とNA2も遺伝的に近縁である。しかし、GA2とは遺伝的に独立した株であり2005/2006、2006/2007シーズンに大流行を起こす原因となったと考えられる。世界的にHRSV-AではGA5とGA2の流行の報告は多い。本邦でもGA5とGA2の報告はあるが、今回、調査を行った新潟では過去2001/2002シーズンからGA5の流行が主であったがGA2の流行はなかった。このため、宿主側にGA2類似株に対する免疫がなく、GA2と遺伝的に近縁であるNA1とNA2が大流行を起こした可能性がある。世界でも今のところ報告がないため不明であるが、我々が収集したレバノン、ベトナムの検体からNA2が検出されており(未発表データ)、世界的にもNA1, NA2を含むGA2近縁株が流行している可能性がある。今後もこうした新たな遺伝子型の出現による大流行が起こる可能性があり、継続的なサーベイランスと分子疫学的解析が重要と考えられる。

一方、HRSV-Bでは2002/2003シーズンにBAが出現したとき60塩基挿入という遺伝的に大きな変化があったにもかかわらず疫学的には大きな流行とならなかったが、この原因は明らかではない。しかし、BAは6シーズンに渡りクラスターを形成しながら継続的な流行を示している。世界的にはBAのクラスターは現在まででBA-I~VIが報告されているが、我々の調査では期間中にBA-II, BA-IV, BA-Vを確認した。BA-Vは2002/2003シーズンに出現した株で世界でも新潟

でしか検出されていない。2003/2004シーズン以後はBA-IVのみの流行となっている。BA遺伝子型は今後も新たなクラスターを作りながら進化する可能性があり、今後の継続的なサーベイランスと分子疫学的解析が必要と考えられた。

E. 結語

我々は2001~2008年の継続的な調査で今までに報告のないHRSV-Aの遺伝子型であるNA1, NA2を新たに発見した。NA1とNA2はGA2近縁株であり2005/2006、2006/2007シーズンの大流行の原因となったと考えられる。特にNA2では平均年齢が高く、2歳以上の罹患と再感染が多いことが示され、遺伝子型と疫学的特徴の関連が示唆された。今後も新たな遺伝子型の出現の早期検知や遺伝子型と臨床的・疫学的特徴との関連の解明のため、継続的なサーベイランスと分子疫学的解析が重要と考えられた。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito R, Li D, Zaraket H, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Hibi S, Sano Y, Shobugawa Y, Oguma T, Suzuki H. Increased Incidence of Adamantane-Resistant Influenza A (H1N1) and A (H3N2) Viruses During the 2006-2007 Influenza Season in Japan. *JID*. 197:630-33 2008.
- 2) 齋藤玲子, 李丹娟, 鈴木康司, Clyde D, 鈴木宏. 東南アジアにおけるインフルエンザ流行. *インフルエンザ*. 9:203-211 2008

1. 学会発表

- 1) Isolde D, Shobugawa Y, Saito R, Suzuki Y, Zaraket H, Clyde D, Suzuki H. Emergence of new genotypes of respiratory

syncytial virus from 2001 to 2008 in a community in Japan. US/Japan Cooperative Medical Science Meeting 13th ARI Subcommittee. 2009年2月16-17 CHIBA.

- 2) 菖蒲川由郷、佐野康子、鈴木康司、小熊妙子、齋藤玲子、鈴木宏。2001-2008年に新潟市内で採取されたヒトRSウイルス(HRSV)の遺伝子進化。第22回東日本外来小児科研究会。2008年10月12 新潟
- 3) 熊木彬彦、菖蒲川由郷、小熊妙子、齋藤玲子、山口正治、鈴木康司、佐々木諭、佐々木亜里美、関奈緒、岩谷淳、岡崎実、鈴木宏。地理情報システム(GIS)を用いた新潟県佐渡島におけるインフルエンザ発生状況の疫学解析。第22回東日本外来小児科研究会。2008年10月12 新潟

II. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図 1

A comparison between a clinic based surveillance in Niigata and national surveillance of yearly epidemic of HRSV infection

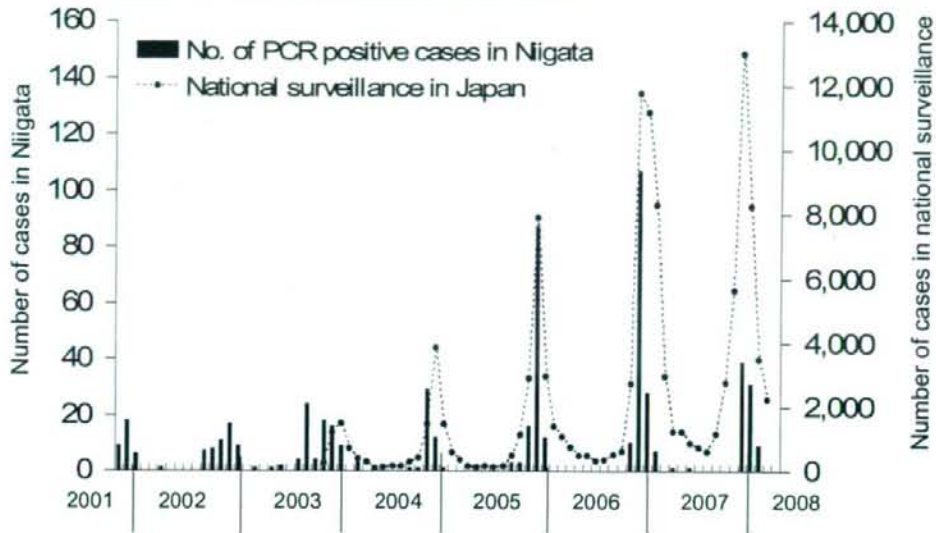


図 2 樹形図解析

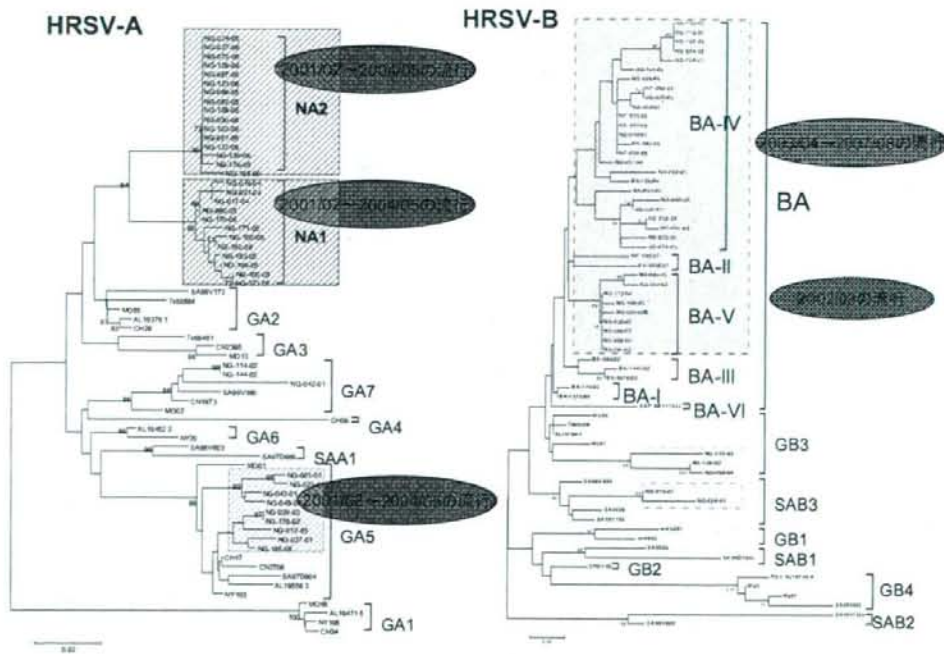
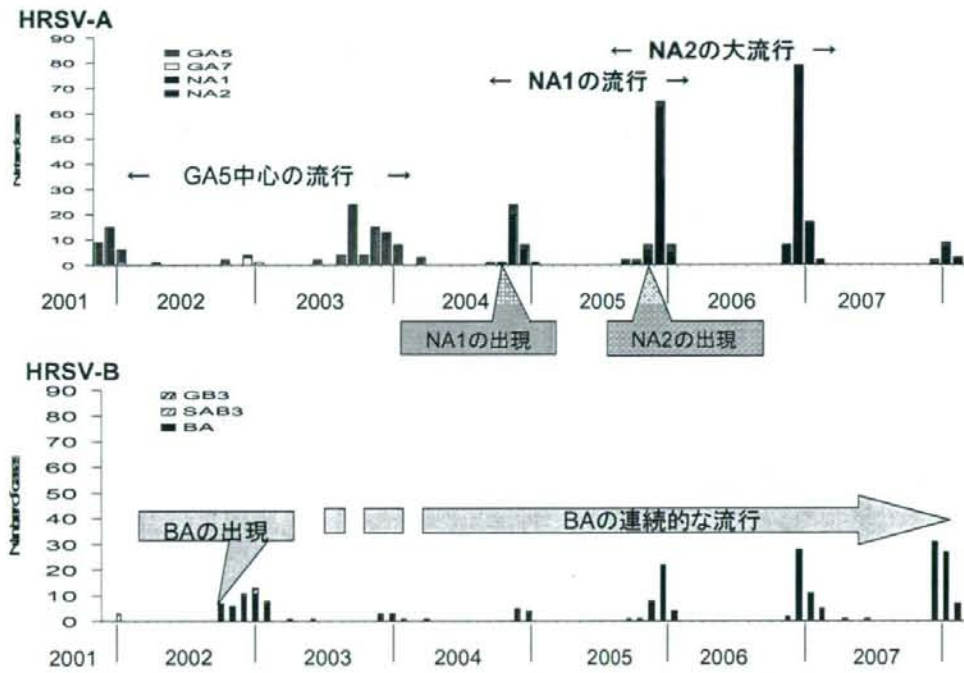


図3 遺伝子型別疫学曲線



【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は安全で有効なワクチンとして世界的に知られておりAIK-Cの Reverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用し、現在ワクチンの開発されていないRespiratory syncytial virus (RSV)に対する組換え生麻疹ワクチンの開発を試みた。麻疹AIK-C全長感染性cDNAのP/M junctionにAsc I 配列を導入しRSV subgroup AのF, Gタンパク遺伝子を挿入し感染性組換え麻疹ワクチン株(MVAIK/RSV-F とMVAIK/RSV-G)を回収した。F, Gタンパクが発現されていることを確認し、精製ウイルス粒子のWestern blottingではウイルス粒子にはRSV外殻タンパクが取り込まれていないことを確認した。麻疹感受性動物であるコトンドラッグに免疫し麻疹ウイルス、RSVに対する抗体産生能を検討した。ワクチン接種3週後には麻疹ウイルスPA抗体が産生され、RSV中和抗体は1週後から検出されMVAIK/RSV/F 免疫後には高い中和抗体が誘導されSubgroup Bに対する交叉免疫を誘導できた。一方、MVAIK/RSV/Gは中和抗体誘導能が低く交叉免疫を示さなかった。更に、MVAIK/RSV/Fの細胞性免疫能の誘導、RSV challenge試験を行う必要がある。

【研究目的】

麻疹ワクチン AIK-C 株の感染性 cDNA クローンを樹立し、弱毒のマーカーを検討してきた。弱毒のマーカーとしては 39°C の高温で増殖しない温度感受性(temperature sensitivity: ts)を特徴とし P タンパク 439 位の Pro が ts の性状に関連していることを明らかとしてきた。また、AIK-C 株全長の感染性 cDNA の中に外来遺伝子を導入して多価抗原を発現する弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用することを検討してきた。今回、Respiratory syncytial virus (RSV) の感染防御抗原と考えられている F もしくは G 外殻タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作製しその性状を解析し、免疫原性を検討した。

【方法】

1) RSV は臨床分離例の Subgroup A の F タンパク、G タンパクの翻訳領域全長を RT-PCR 法で増幅した。プライマー 5' 末端には Nco I, Not I の制限酵素配列を付加し増幅後制限酵素

で処理し、クローニングした。

2) Asc I 制限酵素部位を P/M junction 部位に導入し、R1, R2 配列を付加し外来遺伝子は Nco I, Not I でクローニングし P/M junction に RSV F, G タンパク遺伝子を導入した cDNA を構築した(図1)。

3) 組換え cDNA から感染性キメラウイルスの回収は 293T 細胞に T7 RNA polymerase を発現する組換え Vaccinia virus を感染させ、麻疹ウイルスの転写・複製に必要な N, P, L タンパク発現プラスミドとともに組換え cDNA を co-transfection し 2 日後に B95a 細胞と混合培養した。

4) 回収したウイルスを接種し Vero, B95a 細胞でウイルスの増殖能を検討し、33, 39°C の異なる温度で培養することで温度感受性(ts)検討した。

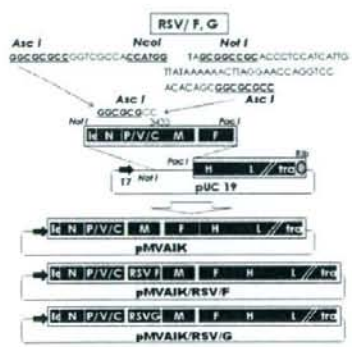
5) RSV に対する polyclonal 抗体を用い、麻疹ウイルスの転写・翻訳は N タンパクに対する monoclonal 抗体を使用し、各々異なる蛍光ラ

ペルした二次抗体で免疫蛍光染色をおこなった。

6) 組換え麻疹ウイルスをB95a細胞で培養し、上清を採取し不連続蔗糖密度勾配を用いて超遠心分画を行った。

7) 7週齢メスのコトンラットに組換え麻疹ウイルス $10^{5.0}$ TCID₅₀ のウイルス液を筋注し、接種前、1、3、5、8週で採血した。麻疹ウイルス抗体はPA法、RSVは50PFUに調整したSubgroup A, Bウイルスを用いて50% plaque抑制法で測定した。

図1. RSV F, Gタンパクを発現する組換え麻疹ウイルスcDNAの構築



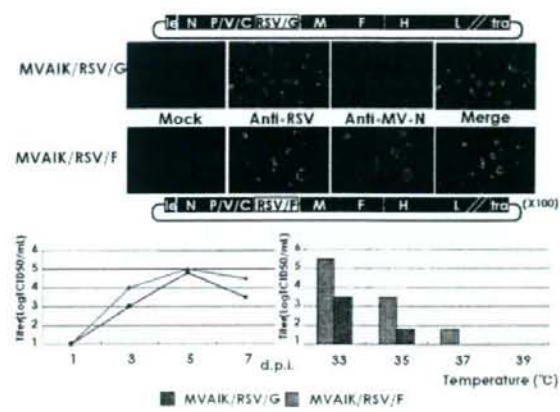
【結果】

1)回収した組換え麻疹ウイルスの性状

回収した MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G を B95a 細胞に接種し RSV polyclonal 抗体、抗麻疹 N タンパク単クローン抗体で二重染色し結果を図 2 に示した。MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G ともに細胞融合を示し、麻疹ウイルス N タンパク発現に一致して RSV 抗原の発現が確認できた。

回収したウイルスを B95a 細胞に接種し 1, 3, 5, 7 日後の培養上清と細胞内感染性ウイルスを検討し結果を図 2 に示した。培養上清中の感染価は 5 日後に $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml に達した。33°C で培養した場合が最も増殖し、39°C では感染性ウイルスは検出されなかった。RSV/G 遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルス MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G は 39°C で増殖しない ts の性状を保持していることが明らかとなった。

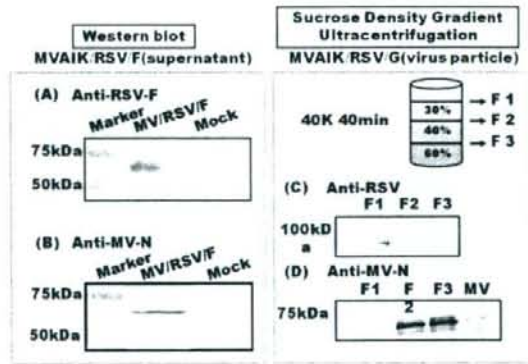
図2. 組換えウイルスの発現とウイルス増殖能



2)精製ウイルスの性状

感染細胞において RSV F, G タンパクの発現を確認したが感染性ウイルス粒子に RSV 外殻タンパクが存在するかを検討した。培養上清を RSV, 麻疹の抗体で Western blotting し結果を図 3 に示した。MVAIK/RSV/F 培養上清に大量の RSV Fタンパクが検出されて麻疹ウイルス N タンパクよりも濃いバンドとして検出された。精製ウイルスを不連続蔗糖密度勾配で分画し麻疹ウイルス感染粒子の分画と異なる軽い分画に RSV Fタンパクが検出され RSV タンパクが麻疹ウイルス粒子には取り込まれていないと考えられた。

図3. 精製ウイルスの性状



3)組換え麻疹ウイルスの免疫能

外来遺伝子を挿入していない MVAIK と RSV を組込んだ MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G ウイルス $10^{5.0}$ TCID₅₀ のウイルス液を各株あたり2

頭に筋注し、接種前、1、3、5、8週で採血した。血清はPBSで10倍に希釈し麻疹ウイルス抗体はPA法で測定した。3週後から1:160以上の高い抗体価が検出された(図4)。

RSV subgroup Aの流行株を50 pfuに調整し2倍階段希釈したラット血清と中和反応後Hep2細胞をもちいて50% plaque抑制法によりRSV中和抗体を測定し結果を図5に示した。MVAIKを接種した2頭にはRSV中和抗体は誘導されなかった。MVAIK/RSV/Gを接種した2頭のうち1頭は接種1週後に1:60の中和抗体が検出されたがもう1頭では5週後に1:20の中和抗体が検出された。MVAIK/RSV/Fを接種した2頭は1:80以上の高い中和抗体を8週まで維持していた。

挿入したRSVはsubgroup Aに属する流行株を用いた。MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/Gで免疫後に得られた血清のsubgroup Bに対する交叉免疫能を検討した。同じく流行株のsubgroup Bを50 pfuに調整し50% plaque抑制法により中和抗体を測定し図6に示した。MVAIK/RSV/G接種後の血清はsubgroup Bに対する中和抗体は検出できなかったがMVAIK/RSV/F接種後の血清では1:80以上の高い中和抗体価を示した。

図4. 麻疹PA抗体の推移

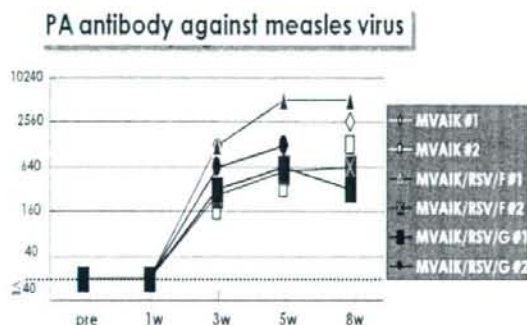


図5. RSV subgroup Aの中和抗体の推移

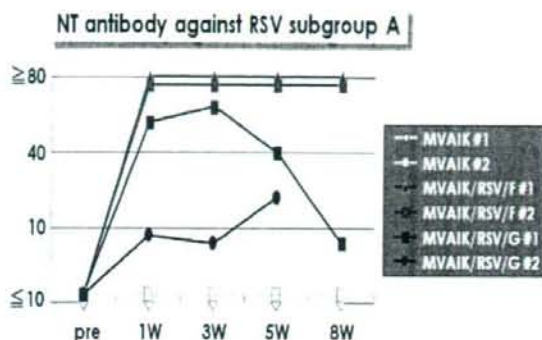
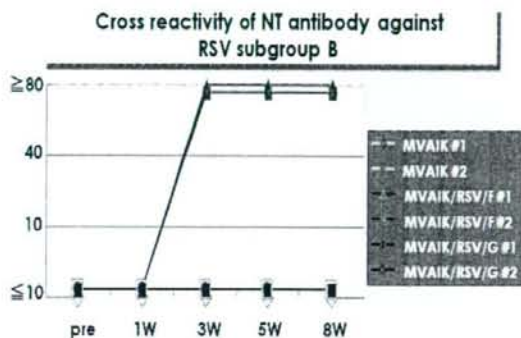


図6. RSV subgroup Bの中和抗体の推移



【考察】

P/M junctionにRSV F, Gタンパク遺伝子を挿入した感染性cDNAクローンからキメラ麻疹ウイルスを回収し、AIK-C株のもつ弱毒マーカーであるtsを保持し外来ウイルスタンパクが発現していることが確認された。ウイルス粒子に外来ウイルスの外殻タンパクが取り込まれているとウイルスの組織親和性が変化する可能性がある。麻疹ウイルスの外殻タンパクであるF, Hタンパクは発現すると粗面小胞体からゴルジ器官を経て細胞表面に移行し、F, Hタンパクの細胞内ドメインとMタンパクが結合し、さらにMタンパクはRNP複合体と結合することで脂質二重膜と共に感染性ウイルス粒子を形成する。挿入されたRSV F, Hタンパクには麻疹ウイルスMタンパクと結合するドメインがないため理論上は麻疹ウイルス粒子に能動的に取り込まれることはないと考えられる。脂質二重膜に表出されたRSV F, Gタンパクを巻

き込んで粒子形成する可能性が考えられるが、RSV F, G タンパクは培養液中に大量に検出され、を超遠心精製したウイルス粒子画分から外来ウイルスタンパクは検出できず麻疹ウイルス粒子には取り込まれていないと考えられた。

MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G で免疫すると麻疹ウイルスに対する抗体は接種 3 週から検出されるが、RSV に対する抗体は接種 1 週後から検出された。組換え麻疹ウイルスの増殖により麻疹ウイルスに対する抗体が誘導され増殖の過程で RSV F, G タンパクは細胞外にも放出されることで早期から RSV に対する中和抗体が検出されたと考えられる。

今回の免疫原性の検討で、いずれの組換えウイルスでも中和抗体は誘導するが MVAIK/RSV/G では中和抗体の抗体価も低く異なる subgroup に対する交叉免疫原性がないことが明らかとなり、一方 MVAIK/RSV/F は高い中和抗体を誘導し交叉免疫活性を示したことから MVAIK/RSV/F がワクチン候補として有望であると思われる。

生ワクチンの方向性として従来のワクチン株の開発方法である低温馴化株が開発されたが安全性が十分ではなくこの低温馴化株の reverse genetics 法を確立し L 遺伝子に変異を導入したり、インターフェロン産生を調節する NS-1, NS-2 欠損株が検討されているが有効で安全なワクチンは開発されていない。ウシパラインフルエンザをヒト型にして RSV 遺伝子を導入した組換え生ワクチンが考えられているが生ワクチンとしての経験がなく課題が多い。AIK-C ワクチンはすでに有効性と安全性が確立されており組換え生ワクチンウイルスベクターとして RSV ワクチンを開発し、麻疹ワクチンは現在皮下接種であるが、吸入でも有効であることが知られおり RSV の外殻タンパクを発現する AIK-C 麻疹ワクチンウイルスを経鼻ワクチンとして利用することが可能である。今回は抗体産生しか検討できなかったが、細胞性免疫能の検討、RSV challenge 試験を行う予定である。

【研究発表】

1. 論文発表

- 1) Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, Okafuji T, Nakayama T. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J Med Virol 2008;80: 517-523.
- 2) Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, Nakayama T. Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation. Vaccine 2008. 26: 9859-9863.
- 3) Sakata M, Komase K, Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. Vaccine 2009. 27: 234-242.
- 4) Nagai M, Ji YX, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-08. J Med Virol (in press)

2. 学会発表

- 1) 森地振一郎 他. 臓器よりエンテロウイルスが陽性であった心内膜繊維弾性症の 1 例 第 49 回日本臨床とウイルス学会 犬山 2008.6.14-15
- 2) 由井郁子 他. RS ウイルス再感染と quasispecies-20 シーズン(1985-2005)の調査 第 49 回日本臨床とウイルス学会 犬山 2008.6.14-15
- 3) 松原啓太 他. ムンプスウイルスにおける EIA 値と F, HN, N タンパク抗体の関連についての検討 第 49 回日本臨床とウイルス学会 犬山 2008.6.14-15
- 4) 竹内 薫 他. 神経芽細胞(SH-SY5Y)におけるムンプスウイルス増殖に重要な領域の同定 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 2008.10.26-28

- 5) Ji YX 他. Amino acid substitutions in Matrix (M), fusion (F), and hemagglutinin (H) proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 2008.10.26-28
- 6) 小河原修 他. 新型インフルエンザワクチンの臨床試験(2) 第12回日本ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 7) 岡田 純 他. 集団感染防止のための入学前麻疹抗体検査とワクチン接種の検討 第12回日本ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 8) 樋口 彰 他. 風疹、ムンプスウイルスの envelop 蛋白を発現する組換え麻疹ワクチン株の作製 第12回日本ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 9) 澤田成史 他. RS ウイルス、インフルエンザウイルスの外殻タンパク質を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製 第12回日本ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 10) 中山哲夫 麻疹ウイルスワクチン株と野生株の鑑別 第40回日本小児感染症学会 名古屋 2008.11.15-16.

【知的所有権の取得状況】

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

「 小児急性呼吸器感染症に関する臨床的、細菌学的研究 」

分担研究者：石和田稔彦（千葉大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨

日本における肺炎球菌 7 価結合型ワクチンの導入効果を計る目的で、小児肺炎の罹患率調査、肺炎症例からの分離肺炎球菌菌株の血清型別、胸部レントゲン診断に関する検討を行った。日本は、欧米に比較し肺炎の罹患率が高く、分離された肺炎球菌の血清型は 7 価ワクチンに含まれているものが多いことから、小児肺炎に対する導入効果が期待された。しかし、肺炎の胸部エックス線診断は、読影者によりバラツキが多く、胸部エックス線の小児肺炎診断の標準化を行う必要があると思われた。

A. 研究目的

肺炎球菌 7 価結合型ワクチン (PCV7) は、欧米において小児肺炎に対する有効性が報告されている。PCV7 は、日本へ近い将来導入される予定となっているが、日本では肺炎球菌性肺炎を含めた小児市中肺炎の発症頻度などに関して不明な点が多く、その有効性を計る指標となるデータが少ない。今回、PCV7 を本邦へ導入した場合の、小児肺炎に対する有効性を計る目的で、以下の研究を実施した。

1. 小児肺炎および血液培養陽性肺炎球菌性肺炎の罹患率に関する検討。
2. 小児肺炎例の血液培養および洗浄喀痰培養から有意に分離された肺炎球菌の血清型に関する検討。

3. 小児肺炎の胸部エックス線診断の読影者による相違に関する検討。

B. 研究方法

1. 千葉県内で血液培養から肺炎球菌が分離された呼吸器感染症の割合を調査する。(小児科入院ベッドを有する千葉県内の全医療機関に対するアンケート調査。調査期間 2003 年～2005 年)
2. 千葉市在住小児で入院した肺炎と、そのうち血液培養陽性であった肺炎の症例数を調査する。(千葉市内の患者が入院する可能性のある千葉市内小児科入院施設 10 施設 11 科、および千葉周辺の小児科入院施設 9

施設9科に対するアンケート調査。調査期間 2005年)

3. 2008年に千葉市の小児肺炎症例の血液培養、洗浄喀痰培養から分離された肺炎球菌の血清型を型別用血清(Statens Serum Institute, Copenhagen)を用いて荚膜膨化試験により実施する。
4. 下気道感染症の診断で入院した症例の20枚の胸部レントゲン写真を31名の小児科医と7名の放射線科医が、それぞれ個別に読影し、その結果を集計する。読影に関しては、日本語の診断名(肺炎・気管支肺炎・細菌気管支炎・気管支炎)とWHOの肺炎診断基準による診断名を用いる。

倫理面への配慮

全ての研究は、千葉大学倫理委員会の承認を得て行っている。臨床データの収集、菌株、胸部レントゲン写真に関しては、個人が特定できないよう配慮して行った。

C. 研究結果

1. アンケート回収率は100%であった。千葉県内で2003~2005年の3年間に血液培養陽性の肺炎球菌全身感染症は130症例あり、そのうち肺炎例は39症例であった。肺炎球菌全身感染症分離株のうち、ペニシリン耐性株は21.7%認められた。
2. アンケート回収率は100%であっ

た。2005年の千葉市在住小児市中肺炎入院例は984名で、このうち5歳未満は854名、5歳未満小児人口1000名あたりの発症率は19.7人/年であった。血液培養陽性の肺炎球菌性肺炎は5例あり、このうち4例が5歳未満であり、発症率は5歳未満人口10万人あたり9.2人/年であった。

3. 肺炎320症例の血液培養から分離された肺炎球菌は2株のみであったが、いずれもPCV7に含まれる血清型であった(6B、19F)。喀痰から優位に分離された肺炎球菌は、43株(13.4%)あり、その血清型は、23F型が最も多く、ついで6B型であった。喀痰分離株のうち77%がPCV7に含まれる血清型であった。

4. 胸部レントゲン写真の読影結果は、読影者間により、バラツキが大きかった。小児科医は、放射線科医に比べ、肺炎と診断する率が高かった。また、WHOの基準を用いると日本語の基準に比べ、小児科医、放射線科医ともに肺炎と診断する率が低下した。

D. 考察

欧米からの小児市中肺炎の発症率に関するいくつかの最近の報告と比較して、今回の結果は高いものであった。ただし、各国より出されたいずれの報告も症例診断基準や集計方法が一定ではなく、結果の比較には注意を要する。より正確に他国のデータと比較するためには同一の画像診断基準を用いて集計することが必要と考えられた。

肺炎症例の血液、喀痰から分離された

肺炎球菌の血清型は、PCV7 に含まれている型が多く、PCV7 導入効果が期待された。

E. 結論

本邦における小児市中肺炎の罹患率および血液・喀痰から分離された肺炎球菌の血清型調査から、PCV7 が導入された場合に、日本でも小児市中肺炎に対する予防効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

荻田純子、石和田稔彦、黒崎知道、有馬聖永、深沢千絵、菱木はるか、星野直、武田紳江、会沢治朗、大嶋寛子、石川信泰、河野陽一

小児市中肺炎および血液培養陽性肺炎球菌肺炎の罹患率調査 感染症学雑誌 82:624-627, 2008

Ishiwada N, Kurosaki T, Terashima I, Kohno Y.

The incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan (2003-2005). Journal of Infection 57:455 - 458,2008

2. 学会発表

荻田純子 石和田稔彦 深沢千絵 菱木はるか 河野陽一

胸部単純写真による小児市中肺炎の診断についての検討～小児科医と放射線科医の比較 WHO の診断基準を用いた試み～

第40回日本小児感染症学会 口演
(2008年11月16日 名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

なし

「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」

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

新型インフルエンザの出現予測をするためには、どのようなウイルスが鳥類の間で優勢になっているかを知ることが重要である。そこで、実際に野外で増殖優勢となったウイルス株を用いて解析したところ、ウイルスゲノムのNP分節とM分節が、鶏胚での増殖能の優劣に関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

新型インフルエンザは、鳥類の間で流行するインフルエンザウイルスがヒトに感染し、馴化することにより発生すると考えられる。したがって、鳥類の間でどのようなウイルスが流行しているか、また、その流行動態にどのような要因が関与するかを明らかにすることが重要である。2005年、中国南部において、それまでのH5N1インフルエンザウイルスとは遺伝的に異なる新たなウイルス（Fujian-like virus）が出現した。Fujian-like virusは鳥類の間で急速に広まり、2006年には同地域で分離されたH5N1ウイルスの大多数を占めるまでになった。しかし、Fujian-like virusがどの様にして他のH5N1ウイルスを抑えて優勢となったのかは謎である。そこで本研究では、その分子メカニズムを解明するため、鶏胚において競合試験を行い、鶏胚での増殖に必要なウイルスゲノム分節の同定を試みた。

B. 研究方法

A/wild bird/Anhui/82/2005 (AH) および

A/chicken/Vietnam/TY31/2005 (TY) をそれぞれ優勢および劣勢ウイルスの代表株とし、遺伝子操作系により、組換えウイルスを作出した。AH および TY 株を 1:1、1:10 あるいは 1:100 の割合で混合し、それぞれ鶏胚で5代継代した。継代後、ウイルス液より抽出したRNAを鋳型としてRT-PCRおよびダイレクトシーケンスを行い、両株間で塩基配列の異なる部位でシグナル強度を比較し、各分節での両株の優劣を評価した。

C. 研究結果

AH および TY 株間で競合試験を行なった結果、AH 株の初期量を10分の1にした場合でも、継代後にはAH株由来のNPおよびM分節がTY株由来のものと同様以上にまで増加していた。TY株のNPあるいはM分節をそれぞれAH株のものに組換えたウイルスを作出し、それらをTY株と競合させた場合でも、同様の結果が得られた。両株のNP、M1 および M2 蛋白質の間には、それぞれ8、1 および 2 アミノ酸の違いが存在する。そこで、TY株に各種変異を導入したウイルス

を作出し、この現象に重要なアミノ酸の同定を試みた。その結果、NP 蛋白質の 34 位、121 位あるいは M2 蛋白質の 66 位のアミノ酸がウイルス増殖の優劣に重要であることが示唆された。

3. その他
該当なし

D. 考察

H5N1 インフルエンザウイルスの鶏胚における増殖性の優劣には NP および M 分節が関与することが明らかとなった。

E. 結論

本研究で得られた成果は、新型インフルエンザの出現予測に際し重要な知見となり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Shimizu K, Li C, Muramoto Y, Yamada S, Chen H, Kawaoka Y. "The NP and M segments of H5N1 influenza viruses are responsible for dominance in embryonated eggs" The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sept 11, 2008

清水健太、Chengjun Li、村本裕紀子、Hualan Chen、河岡義裕「H5N1 インフルエンザウイルスの鶏胚における dominance には NP および M 分節が関与する」第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月 28 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

中耳炎の病因微生物と免疫応答の解析

研究分担者 山中 昇

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨

- 1) 肺炎球菌は急性中耳炎をはじめとする上・下気道感染症の重要な起炎菌であり、ワクチンによる感染予防が期待されている。本研究は肺炎球菌表面蛋白抗原PspAを用いた母体免疫により、新生児マウスに肺炎球菌特異的免疫応答が誘導されるとともに、肺炎球菌感染が予防されることを明らかにした。すなわち、免疫能の未成熟な乳幼児期における感染予防法として、母体免疫により乳幼児期に特異的な免疫応答の誘導が可能であり、肺炎球菌感染症の予防法として有用であることを明らかにした。妊娠前の母体に免疫を行うことで安全に新生児期の免疫応答が誘導され、今後のワクチンの開発および肺炎球菌感染症予防において重要な知見が得られた。
- 2) 近年、小児急性中耳炎の難治化が耳鼻咽喉科の日常臨床において大きな問題となっている。その原因の一つとしては、細菌の形成するバイオフィルムの関与が指摘されている。本研究では、急性中耳炎の難治化における無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルム形成の役割について検討し、急性中耳炎患児から分離された無莢膜型インフルエンザ菌が、バイオフィルムを形成することを明らかにした。また、無莢膜型インフルエンザ菌はバイオフィルムを形成することにより抗菌薬に抵抗し、遷延・難治化といった急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示された。

A. 研究目的

1) 肺炎球菌は急性中耳炎をはじめとする上・下気道感染症の重要な起炎菌であり、ワクチンによる感染予防が期待されている。今回我々は肺炎球菌表面蛋白抗原 PspA を用いた母体免疫によるマウスにおける肺炎球菌特異的免疫応答の誘導および感染予防についての検討を行った。

2) 近年小児急性中耳炎の難治が日常臨床における大きな問題となっており、その原因の一つとして細菌の形成するバイオフィルムの関与が指摘されている。バイオフィルムとは細菌が感染病巣局所において産生する菌体外多糖からなる粘液状のマトリックスであり、その内部に細菌が存在する。多くの細菌が生体内ではバイオフィルムの状態で存在しており、抗菌薬や生体の感染防御に対して抵抗性を示す。本研究では急性中耳炎の難治化における無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルム形成の役割について検討した。

B. 研究方法

1) BALB/C マウス (4 週齢、雌) に、PspA をコレラトキシン B をアジュバントとし 1 週間に 2 回 3 週間経鼻免疫を行った。最終免疫後、雄マウスと交配し、約 3 週の後に新生児マウスを得た。免疫後の母マウスの血清中の抗

PspA 特異的 IgG 抗体価および母乳中の抗 PspA 特異的 IgG 抗体価、新生児マウス血清中の抗 PspA 特異的 IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。また、新生児マウスに肺炎球菌 TIGR4 株 (血清型 4 型、PspA family 2) を腹腔内接種し、致命的肺炎球菌全身感染に対する予防効果の検討を行った。

2) 急性中耳炎患児より分離された無莢膜型インフルエンザ菌を用いて、ピン付き 96well プレート上でバイオフィルム形成能を検討した。バイオフィルムの定量的解析法として crystal violet 染色法を用い、画像的解析法として共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。定量における陽性株判定法としては、陽性コントロール株の OD 値に対する各菌株の OD 値の割合を biofilm formation index (BFI) と定め、 $BFI \geq 0.4$ である株をバイオフィルム形成株とした。

C. 研究結果

1) PspA 母体経鼻免疫により、母マウス母乳及び血清、新生児マウスの血清中に抗 PspA 特異的 IgG 抗体が誘導された。また PspA 免疫群の新生児マウスは、非免疫群に比べて全身感染後の生存時間が延長された。

2) 小児急性中耳炎症例より採取した無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株において、安定したバイオフィル

ム測定システムを確立することができた。この測定システムにより中耳炎分離株 70 株のうち 59 株 (84%) にバイオフィーム形成を認めた。薬剤感受性とバイオフィーム形成との関連を見ると、ABPC の耐性株に比較して、感受性が高い株ほどバイオフィーム形成株を多く認めた。急性中耳炎の臨床経過とバイオフィーム形成との関連について検討すると、抗菌薬治療非改善例から分離されたインフルエンザ菌では、抗菌薬治療改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィーム形成能を認めた。

D. 考察及び結論

肺炎球菌感染症は 2 歳未満の乳幼児に好発するため、従来までの荚膜多糖体抗原ワクチンでは、効果的な免疫応答が誘導されにくい。PspA の母体経鼻免疫により、免疫能の未熟な乳幼児期に特異的免疫応答が誘導可能であり、肺炎球菌感染症の予防方法として有用と考えられた。さらに急性中耳炎患者から分離された無荚膜型インフルエンザ菌がバイオフィーム形成を行うことが明らかとなり、加えて無荚膜型インフルエンザ菌のバイオフィーム形成が、抗菌薬治療に抵抗し遷延・難治化する急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsurahara T, Hotomi M, Yamauchi K, Billal DS, Yamanaka N: Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). *J Infect Chemother.* 2008 Dec;14(6):393-8.
2. Yamanaka N, Hotomi M, Billal DS: Clinical bacteriology and immunology in acute otitis media in children. *J Infect Chemother.* 2008 Jun;14(3):180-7.
3. Hotomi M, Billal DS, Kamide Y, Kanesada K, Uno Y, Kudo F, Ito M, Kakehata S, Sugita R, Ogami M, Yamanaka N: Serotype distribution and penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluids of pediatric patients with acute otitis media in Japan. *Advanced Treatment for Otitis Media Study Group (ATOMS).* *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3808-10.
4. Billal DS, Hotomi M, Shimada J, Fujihara K, Ubukata K, Sugita R, Yamanaka N: Prevalence of *Streptococcus invasive locus (sil)* and its relationship with macrolide resistance among group A *Streptococcus* strains. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1563-4.
5. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N: Wealth and child survival: India and Bangladesh. *Lancet.* 2008 Oct 25;372(9648):1459.
6. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N: Rotavirus vaccine for developing countries. *Lancet.* 2008 Aug 9;372(9637):444; author reply 445.
7. Moriyama S, Hotomi M, Shimada J, Billal DS, Fujihara K, Yamanaka N: Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx.*