

ミビル投与の臨床効果が低下し、成人では臨床効果の低下がそれほど顕著ではないという結果であった(6、7、8)。オセルタミビルについては、重症化阻止や肺炎合併例に対する治療効果に関する評価は確定しておらず(9)、耐性株に対するオセルタミビル投与の臨床的意義は不明である。

一方、すべてのオセルタミビル耐性株は、ザナミビルに対して感受性を保持していることから、オセルタミビル耐性株に対してはザナミビルによる治療は有効であると考えられる。また現在のところ、オセルタミビル耐性株を含むほとんどのA/H1N1pdm 国内分離株の抗原性はワクチン株 A/California/7/2009 に類似しており、新型インフルエンザワクチンは、オセルタミビル耐性 A/H1N1pdm 株にも有効であると考えられる。

H275Yに加えて I223R にアミノ酸置換をもったウイルスは、オセルタミビルおよびペラミビルに対する高い耐性を獲得するとともに、ザナミビルに対してもある程度の耐性を示すことが報告されており(米国 CDC 情報)、今回の解析でも同様の結果が得られている。

2010年1月には、経口投与のオセルタミビルと吸入投与のザナミビルに加えて新たに点滴静注投与のペラミビルが国内発売され、NA 蛋白を標的とする抗インフルエンザ薬は3種類になった。ペラミビルのノイラミニダーゼ阻害機構およびそれに関わる分子構造は基本的にはオセルタミビルと同一であり、オセルタミビルとは交差耐性を示すことが明らかになっている。今後、医療機関でのペラミビル使用量が増すと、ペラミビル耐性株の出現も危惧される。一方、ザナミビルと同様の作用機序をもつイナビルが承認されたことから、これらの新規抗インフルエンザ薬2剤に対する薬剤感受性試験系を確立した、今後、これらを含めた4剤について、この2つのマーカーについて耐性モニターの標的対象を広げ、耐性モニターを実施している。

一方、分離頻度は極めて少なくなったとはいえ、季節性インフルエンザ A/H1N1 株は完全には地球上から消滅していない。したがって、A/H1N1pdm

株と季節性 A/H1N1 株との間で遺伝子再集合が起こり、ヒトからヒトへの感染伝播力を獲得した A/H1N1pdm の耐性株が出現する可能性も否定できないことから、引き続き薬剤耐性株の発生状況を監視する必要がある。

参考文献

- 1) WHO: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_us_e_antivirals_20090820/en/index.html (新型および季節性インフルエンザに対する薬物治療ガイドライン)
- 2) IASR 31: 49-53, 2010 (新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第1報])
- 3) IASR 30: 101-106, 2009 (2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報])
- 4) Arnold S Monto, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 50: 2395-2402, 2006
- 5) Masato Tashiro, et al., Antiviral Therapy 14: 751-761, 2009
- 6) Naoki Kawai, et al., J Infect. 59: 207-212, 2009
- 7) Naoki Kawai, et al., Clinical Infectious Diseases 49: 1828-1835, 2009
- 8) Reiko Saito, et al., Pediatr Infect Dis J 29, 2010
- 9) Tom Jefferson1, et al., Cochrane Database of Systematic Reviews 2010, Issue 2, 2010

E. 結論

H1N1pdm ウイルスについて、オセルタミビル耐性ウイルスは 1.2%以下の低頻度で検出されたが、これらの多くはオセルタミビル使用例であり、ペラミビルに対しても交叉耐性を示した。いずれも伝播拡大伝播傾向は認められなかった。一方、ザナミビル耐性ウイルスは検出されなかった。

今後、新たな薬剤を含めた耐性モニターを継続

強化していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichinohe, T., Ainai, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.
2. Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.
3. Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 67-71, 2010.
4. Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Aoki, Y., Suto, A., Abiko, C., Sanjoh, K., Sugawara, K., Takashita, E., Itagaki, T., Katsushima, Y., Ujike, M., Obuchi, M., Odagiri, T., Tashiro, M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir *Virology J.* 7:53, 2010.
5. Ichinohe, T., Ainai, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Odagiri, Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H., Ichinohe, T. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* Volume 82; 1754–1761, 2010
6. Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A(H1N1) during the 2007-2009 Influenza Seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 16; 926-935, 2010
7. Oakley, A J., Barrett, S., Peat, T.S., Newman, J., Victor A., Streltsov, V. A., Waddington, L., Saito, T., Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J. L. Structural and functional basis of resistance to neuraminidase Inhibitors of Influenza B viruses. *Med. Chem.* 2010. DOI: 10:1021/jm 100621s
8. Kuroda, M., Katano, H., Nakajima, N., Tobiume, M., Ainai, A., Sekizuka, T., Hasegawa, H., Tashiro, M., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Hata, S., Watanabe, M., Sata, T. Characterization of quasispecies of pandemic

2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by *de novo* sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS ONE PLoS ONE 5(4): e10256, 2010. (doi:10.1371/journal.pone.0010256)

9. Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan PLoS ONE 5(6): e11057. doi:10.1371/journal.pone.0011057

10. Ikeno, D., Kimachi, K., Kino, Y., Harada, S., Yoshida, K., Tochiwara, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Okada, K., Miyazaki, C., Ueda, K. Immunogenicity of an inactivated, adjuvanted whole-virion influenza A(H5N1,NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol. Immunol. 54: 81-88, 2010

11. Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. J. Med. Virol. 83:10-15 2011

12. Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M. Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional

and real-time RT-PCR assays. Jpn. J. Infect. Dis. (in press, 2011)

13. Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniel, R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Opp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zambon, M., Public Health Implications of Oseltamivir Resistance: Emergence in Pre-pandemic Influenza A(H1N1) Viruses during the 2007 - 2009 Seasons. Influenza and other respiratory viruses Resp. Viral. Infect. (in press, 2011)

G. 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。

新型インフルエンザのウイルス学・病態解析と感染制御法の検討

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

パンデミック(H1N1) 2009 ウイルスの種特異性に関与するアミノ酸を調べるため A/California/04/09 (CA04) のマウス馴化株 (MA-CA04) を作製した。MA-CA04 株で認められたアミノ酸変異のマウスにおける病原性を解析した結果、PA の 21 番目と 616 番目、HA の 127 番目と 222 番目、NP の 375 番目のアミノ酸の変異が、それぞれマウスへの病原性獲得に寄与していることが分かった。特に、HA の 127 番目の変異は、マウス肺での持続的なウイルス増殖に関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

2009 年春、豚由来の H1N1 ウイルスによる新型インフルエンザパンデミックが発生し、瞬く間に世界各地に広がった。パンデミック(H1N1) 2009 ウイルスは、ヒトへ侵入して間もないため、今後ヒトの間で感染を繰り返していく間に、よりヒトに適応した様々な変異を獲得していくと考えられる。そこで、パンデミック(H1N1) 2009 ウイルスの、新しい宿主への適応の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、ヒトから分離したパンデミック(H1N1) 2009 ウイルスをマウスに馴化させ、アミノ酸変異と病原性の変化を調べた。

B. 研究方法

パンデミック発生初期のウイルス株である A/California/04/09 (CA04) 株を、4-6 週齢の BALB/c マウスの肺で 10 回継代しマウスに馴化させ、マウスへの病原性を獲得したマウス馴化株 (MA-CA04) を得た。さらに、リバーシジェネティクス法にて、MA-CA04 株で認められた変異を親株の CA04 株に導入したウイルス株を作出し、マウスでの病原性を調べ、マウスでの病原性獲得に寄与しているアミノ酸変異を同定した。

C. 研究結果

MA-CA04 株では、継代前の CA04 株

と比べ、8個（PB1 および NP に1個ずつ、PA および HA に3個ずつ）のアミノ酸配列の変異が認められた。それぞれの変異をもつウイルス株のマウスへの病原性を比較した結果、PA の21番目（Met→Ile）および616番目（Ser→Pro）、HA の127番目（Asp→Glu）および222番目（Asp→Gly）、NP の375番目のアミノ酸の変異（Asp→Asn）がそれぞれ、マウスへの病原性獲得に寄与していることが分かった。特に、HA の127番目の変異は、マウス肺での持続的なウイルス増殖に関与していた。

D. 考察

MA-CA04 株で変異が認められた NP の375番目は、鳥のウイルスでは Asp が、最近のパンデミック H1N1 ウイルスでは Asn がよく保存されており、広く宿主域に関与している部位であることが示唆された。さらに、HA で変異が認められた3つのアミノ酸は、いずれもレセプター結

合部位近辺に位置しており、鳥型および人型のレセプターに対する親和性を変化させていると考えられた。

E. 結論

パンデミック(H1N1) 2009 ウイルスが、今後ヒトで増殖を繰り返す中で、HA ならびにウイルス RNA 合成に関与するポリメラーゼ複合体に変異が導入され、よりヒトに馴化したウイルスに変わっていく可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Programme of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010)
動物インフルエンザのサーベイランスと感染制御体制の検討

研究分担者 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： インフルエンザウイルスの自然宿主は野生の水禽であり、ヒトと動物のすべてのインフルエンザウイルスの起源は、この野生水禽由来のウイルスである。よって鳥インフルエンザのサーベイランスはその制圧のための疫学情報のみならず、ヒトの新型ウイルスの出現予測のためにも有益な情報が得られる。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実施し、分離されたウイルスの遺伝子、抗原性および動物に対する病原性を明らかにし、インフルエンザの予防、診断および治療に役立てることを目的とする。2010年は日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取された家禽、渡りガモおよびハクチョウの材料5,642検体から合計85株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらの分離株の中で、2010-2011年に国内の野鳥から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、2010年5月にモンゴルの野鳥から分離されたH5N1ウイルスと極めて近縁であり、H5N1ウイルスが夏季にシベリアの営巣湖沼で受け継がれ、秋の渡りのシーズンに日本に運ばれたと考えられる。また、2009年にベトナムの家禽から分離されたH9N2ウイルスは、マウスと豚で高い増殖性を示すことがわかった。ヒトへの感染リスクが高いと考えられるこれらのウイルスの流行を家禽の中で抑える対策を徹底する国際連携が喫緊の課題である。

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。ヒトを含む哺乳動物および鳥類のインフルエンザ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明らかになっている。これらのことから本研究では、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の抗原性、遺伝子性状および動物に対する病原性を明らかにし、ヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

日本、モンゴル、ベトナム、香港において家禽と野鳥から採取した気管ぬぐい液および糞便からインフルエンザAウイ

ルスの分離を試みた。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。さらに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。

2010-2011年に国内の野鳥から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの塩基配列を近年アジア地域で分離されたH5N1ウイルスのそれと比較し、系統解析を行った。

ベトナムのアヒルから分離されたH9N2低病原性鳥インフルエンザウイルス3株A/duck/Vietnam/OIE-2327/2009 (H9N2)、A/duck/Vietnam/OIE-2328/2009 (H9N2)、A/duck/Vietnam/OIE-2583/2009 (H9N2)を豚とマウスに接種し、ウイルスの各動物に対する病原性を比較した。

C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便5,642検体から合計85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からH11の11の亜型に、NA亜

型はN1、N2、N3、N4、N6、N7、N8、N9の8つの亜型に区分された。分離されたウイルスにはH5N1亜型のウイルスも含まれており、モンゴル、香港、日本の野鳥から分離されたウイルスは高病原性鳥インフルエンザウイルスであった。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加した。

2010-2011年に国内の野鳥から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、2010年5月にモンゴルの野鳥から分離されたH5N1ウイルスと遺伝的に極めて近縁であり、遺伝子クレードは2.3.2であった。モンゴルおよびシベリアの養鶏場で高病原性鳥インフルエンザの発生がないことから、これらのウイルスは中国の家禽から環境中に拡散したウイルスが野鳥に感染し、春に北方に渡った後もウイルスが夏季にシベリアの営巣湖沼で受け継がれ、秋の渡りのシーズンに日本に運ばれたと考えられる。

ベトナムのアヒルから分離されたH9N2低病原性鳥インフルエンザウイルス3株A/duck/Vietnam/OIE-2327/2009 (H9N2)、A/duck/Vietnam/OIE-2328/2009 (H9N2)、A/duck/Vietnam/OIE-2583/2009 (H9N2)を豚とマウスに接種し、各動物に対するウイルスの病原性を比較したところ、G1遺伝子系統のPB2遺伝子を有するA/duck/Vietnam/OIE-2583/2009 (H9N2)がマウスと豚で高い増殖性を示した。このことから、H9N2ウイルスの哺乳動物に対する病原性にPB2遺伝子が関与していることが示唆された。

D. 考察

ヒトへの感染リスクが高いと考えられるウイルスの流行を家禽の中で抑える対策を徹底する国際連携が喫緊の課題である。また、サーベイランスで分離される様々な亜型のウイルスは、ヒトと動物のインフルエンザの予防、診断および治療法の開発に有用なバイオリソースとなる。

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. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isoda N, Tsuda Y, Sakoda Y, and Kida H. (2010) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. *Arch Virol, in press.*
- (2) Feng F, Miura N, Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H and Nishimura S. (2010) Novel trivalent anti-influenza reagent. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 3772-3776.
- (3) Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J Biol Chem.*
- (4) Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41, 351-357.
- (5) Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) Characterization of H5N1

- highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406, 88-94.
- (6) Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. *J Neurovirol* 16, 125-132.
- (7) Miyake T, Soda K, Itoh Y, Sakoda Y, Ishigaki H, Nagata T, Ishida H, Nakayama M, Ozaki H, Tsuchiya H, Torii R, Kida H and Ogasawara K. (2010) Amelioration of pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. *J Med Primatol* 39, 58-70.
- (8) Itoh Y, Ozaki H, Ishigaki H, Sakoda Y, Nagata T, Soda K, Isoda N, Miyake T, Ishida H, Okamoto K, Nakayama M, Tsuchiya H, Torii R, Kida H and Ogasawara K. (2010) Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
- (9) Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H and Takada A. (2010) Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 5, e8553.
2. 学会発表
- (1) 「台湾のニワトリから分離された低病原性H5N2インフルエンザウイルスの病原性獲得」曾田公輔、Cheng Ming-Chu、遠藤真由美、吉田裕美、Lee Ming-Shiuh、Lee Shu-Hwae、岡松正敏、迫田義博、Wang Ching-Ho、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (2) 「ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの性状解析」野村直樹、迫田義博、遠藤真由美、吉田裕美、山本直樹、岡松正敏、櫻井健二、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (3) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (4) 「RT-LAMPによるインフルエンザウイルス遺伝子の検出とスクリーニング法としての有用性評価」吉田裕美、迫田義博、遠藤真由美、本島昌幸、吉野史、山本直樹、岡松正敏、副島隆浩、仙波晶、神田秀俊、櫻井健二、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (5) 「モンゴルの野生水禽から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、吉田裕美、佐藤由佳、岡松正敏、Damdinjav Batchhluun, Ruuragchaa Sodnomdarjaa、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (6) 「Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin, A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)」M. Okamatsu, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)

- (7) 「H9N2 Avian Influenza Virus Acquires High Pathogenicity by the Introduction of a Pair of Di-basic Amino Acid Residues at the Hemagglutinin Cleavage Site and Consecutive Passages in Chickens」 K. Soda, S. Asakura, M. Okamatsu, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (8) 「H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice」 N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamatsu, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (9) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部 第44回夏季シンポジウム (2010年、洞爺湖)
- (10) 「H9インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか?」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第149回日本獣医学会学術集会 (2010年、東京)
- (11) 「豚由来H1N1パンデミックインフルエンザワクチン候補株の選抜」岡松正敏、山本直樹、迫田義博、喜田宏 第149回日本獣医学会学術集会 (2010年、東京)
- (12) 「野生水禽から分離されたインフルエンザウイルスA/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)の性状解析」山本直樹、本島昌幸、吉野史、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第149回日本獣医学会学術集会 (2010年、東京)

G. 知的財産の出願、登録状況
 予定なし。

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））
分担研究報告書

経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究協力者：相内章（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨：2009年よりヒトで流行したインフルエンザウイルス A/H1N1pdm に対するワクチンは成人で1回の接種で十分な血清中の中和抗体応答が得られた。過去の季節性インフルエンザウイルス感染やワクチン接種による免疫記憶が、A/H1N1 pdm ワクチン接種後の免疫応答に影響を及ぼしたと考えられる。本研究では、感染またはワクチンで免疫された後、抗原性の異なるワクチン株で経鼻ワクチンによる追加免疫した場合の免疫応答について血清中の中和抗体、気道粘膜上に分泌される IgA 抗体の反応性、感染防御及び交叉防御能について検討した。

A. 研究目的

2009年、従来流行していた季節性インフルエンザウイルスとは抗原性が異なる新型インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm)が大流行した。成人での A/H1N1 pdm に対するワクチン接種は、1回の皮下接種により十分な血清での中和抗体応答が得られた。これは過去の季節性インフルエンザウイルス感染やワクチン接種による免疫記憶が、A/H1N1 pdm ワクチン接種後の免疫応答に影響を及ぼしたためと考えられる。不活化ウイルス粒子を用いた経鼻ワクチンでは、感染を伴わずに感染防御に有用な粘膜免疫の誘導が可能であるが、初回免疫と追加免疫で抗原性が異なった場合や、ワクチン接種前に感染歴を持つ場合に誘導される免疫応答についてはその交叉応答性について明らかでない。

本研究では、経鼻ワクチン接種において初回免疫と抗原性の異なるワクチン株で追加免疫した場合の免疫応答について血清中の中和抗

体、気道粘膜上に分泌される IgA 抗体の反応性、感染防御及び交叉防御能について検討した。

B. 研究方法

材料と方法：

ウイルスは、A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1)株 A/Narita/1/09 (H1N1 pdm)株を用いた。また、ワクチンは、A/PR8(H1N1)あるいは、A/Narita/1/09 (H1N1 pdm)株にホルマリンを終濃度 0.05%になるよう添加した全粒子不活化ワクチンを用いた。

5週齢の BALB/c マウスに A/PR8 株 生ウイルス感染、A/PR8 又は A/Narita 株ワクチンを経鼻接種した。1匹当たりのウイルス接種量は A/PR8 株・A/Narita 株 1000 PFU、全粒子ホルマリン不活化ワクチンは 1 µg とし、左右の鼻腔へ 2 µL ずつ接種した。その 3週間後に A/PR8 株あるいは A/Narita 株のワクチンを追加免疫した。追加免疫では、A/PR8 初回感染群

には A/Narita 株ワクチンを接種し、初回感染と追加免疫で異なるワクチン株を接種した。2 回目のワクチン接種から 2 週間後にマウス馴化 A/Narita 株を攻撃感染させ、その 3 日後に鼻腔洗浄液と血清を回収した。

ウイルスの感染後に得られた鼻腔洗浄液を用いて、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイによりウイルス価を測定した。また、インフルエンザウイルスタンパク ヘマグルチニン (HA) に対する抗体応答の測定を ELISA にて行った。抗原には A/Narita 株あるいは A/PR8 株の組換え HA を使用し、スタンダード抗体は A/Narita 株感染回復マウスから得た血清中の IgA, IgG を定量したものをを用いて、HA に対して特異的な血清中の IgG 応答、鼻腔洗浄液中の IgA 応答を比較した。血球凝集阻止試験 (HI 試験) により産生された抗体の交叉反応性を検討した。

C. 研究結果

ウイルス増殖抑制に与える初回免疫の影響
経鼻ワクチン接種以前に同一亜型のインフルエンザウイルス感染歴を持つと攻撃感染後のウイルスの増殖をより抑える事が明らかとなった。攻撃感染 3 日後に回収した鼻腔洗浄液中のウイルス価について、プラークアッセイにより測定した (図 1)。鼻腔でのウイルス増殖について、初回免疫時に A/PR8(H1N1) の感染歴を持つ群は、感染歴を持たない群に比べて有意にウイルスの増殖を抑えることがわかった。さらに、A/PR8(H1N1) 感染歴を持つ群に、異なる株である A/Narita(H1N1pdm) 株経鼻ワクチンを接種した場合でも、ワクチン接種しない場合に比べて有意にウイルスの増殖を抑えた (図 1)。また、初回免疫はワクチン接種より感染刺激の方がよりウイルスを排除した。

鼻腔粘膜上の HA 特異的分泌型 IgA 抗体の追加免疫による上昇

鼻腔洗浄液に含まれる特異的分泌型 IgA 抗体量、血清に含まれる IgG 抗体量を ELISA にて測定した。鼻腔での IgA 抗体応答は、初回免疫で A/PR8 株に感染し追加免疫にて A/Narita 株ワクチン接種をした群でもっとも多く誘導された。A/PR8 感染初回免疫をした群で追加免疫に A/Narita ワクチンを接種した群と PBS を接種した群の抗体応答を比較すると、IgG 応答は両者に差が見られないのに対し、IgA 応答は、追加免疫で A/Narita 株ワクチンを接種した群は多くの特異的 IgA 抗体が分泌されていることがわかった。

D. 考察

初回免疫で A/PR8 感染、追加免疫にて抗原性が異なる A/Narita 株経鼻ワクチンで免疫すると、交叉反応性の高い免疫が誘導される。暴露歴の無い新型のワクチンを接種する以前に、異なる株での感染歴があると、抗原性の異なる株に対する交叉中和能が高くなる。血清中の IgG 抗体量では抗体産生に対して差が無い場合でも鼻腔粘膜上での IgA 抗体産生に差があり感染では局所で産生された IgA 産生記憶 B 細胞に何らかの差が見られる可能性が示唆された。

E. 結論

経鼻インフルエンザワクチンの接種前に同一亜型のインフルエンザウイルスによる感染を受けると交叉防御能の高い粘膜免疫が誘導されやすくなる事が示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. **Intern Med.** 2010;49(5):491-5. Epub 2010 Mar 1.
2. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. **J Med Virol** 2010 Oct;82(10):1754-61.
3. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. **PLoS One.** 2010 Apr 23;5(4):e10256.
4. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal

Antibodies from Plasmids. **Jpn J Infect Dis.**

2011 Jan;64(1):40-9.

5. Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H.

Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. **Hum Vaccin.** 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
2. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎 本邦初の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm)肺炎の剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
3. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉 新型インフルエンザ (A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した 1 剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
4. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
5. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンによるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島

6. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
7. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
8. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS 発症マウスモデルにおける IFN- γ の投与効果 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
9. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応について 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
10. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福土秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死感染を起したイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
11. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
12. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
13. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シャペロン阻害剤による Tax と Tax 結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
14. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) の増殖性に関する検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
15. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
16. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
17. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
- 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

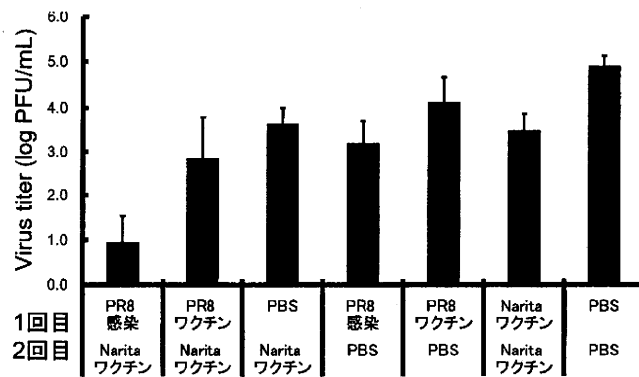


図1 : A/Narita/1/09 (H1N1 pdm) 攻撃感染後の鼻腔洗浄液のウイルス価

A/Narita (H1N1 pdm) HAに対する抗体応答

A/PR8 (H1N1) HAに対する抗体応答

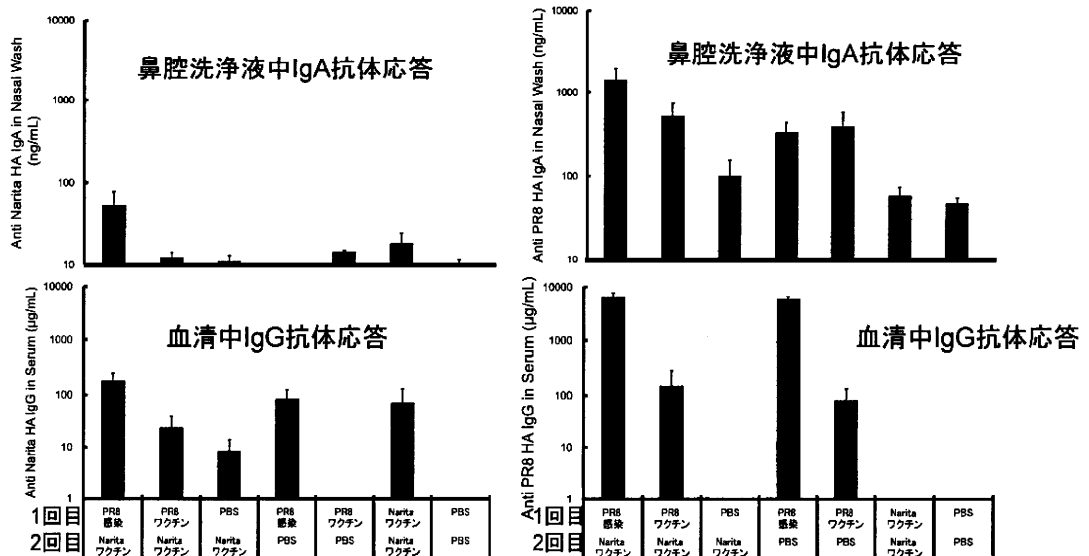


図2: HA特異的抗体応答の評価

「重症呼吸器感染症におけるライノウイルス流行パターンと
株間による重症化の比較」

研究分担者 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（東北大学）

研究要旨

フィリピン・レイテ島において小児重症肺炎患者より PCR にてライノウイルスの検出を試みた。24ヶ月間の研究期間中に、小児患者 1,067 名のうち 293 件（27%）よりライノウイルスが検出された（A 型:49%, B 型:9%, C 型:42%）。A~C 型間で流行様式が異なること、および系統により病原性が異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ライノウイルスはウイルス性呼吸器感染症から高率に検出されるウイルスの一つとされている。しかし、ウイルス分離が困難であるため、近年は PCR などのウイルス遺伝子の検出が行われるようになった。ライノウイルスには A 型と B 型に大きく分類されるが、更に 100 以上の血清型があるとされている。2006 年に新しい C 型ライノウイルスが検出された。欧米を中心とした温帯からの論文では、既知のライノウイルス以上に一般的なウイルスと報告されている。しかし、熱帯におけるその流行パターンや小児重症呼吸器感染に与える影響はいまだよくわかっていない。

本研究ではフィリピンの一医療施設に入院を必要とした重症肺炎患者におけるライノウイルス（A, B, C）流行パターンと株間における重症化の比較を行った。

B. 研究方法

2008 年 5 月から 2010 年 5 月までに、フィリピン・レイテ島、東ビサヤ地域医療センター（以下 EVRMC）にて重症肺炎と診断され入院した小児（生後 7 日から 14 歳）から咽頭拭い液を採取し、5' Non-coding region (5' NCR) を増幅する PCR にてスクリーニングを行った。陽性であったものについて、同領域および VP4 領域のシーケンス解析をおこないライノウイルスの遺伝型（A~C 型）及び系統を決定した。ライノウイルス陽性であった患者について、臨床データや患者転帰などを比較検討した。

本研究を開始するにあたり、東北大学医学系研究科、フィリピン熱帯医学研究所、および EVRMC の倫理委員会より承認を得た。また、研究協力者を募る際、実験の主旨を説明し、保護者から同意を得ている。

C. 研究結果

2008年5月から2010年5月までに重症肺炎として入院した小児患者1,067名のうち293件(27%)よりライノウイルスが検出された。(図1) それらを遺伝子型で分類

すると、A型が49%、B型が9%、C型が42%となった。全ライノウイルスは一年を通じて検出されていたが、系統にわけたところ(系統数=A:12、B:1、C:10 β 値<0.2) AとCで異なる流行パターンを示す可能性が示唆された。(図2)

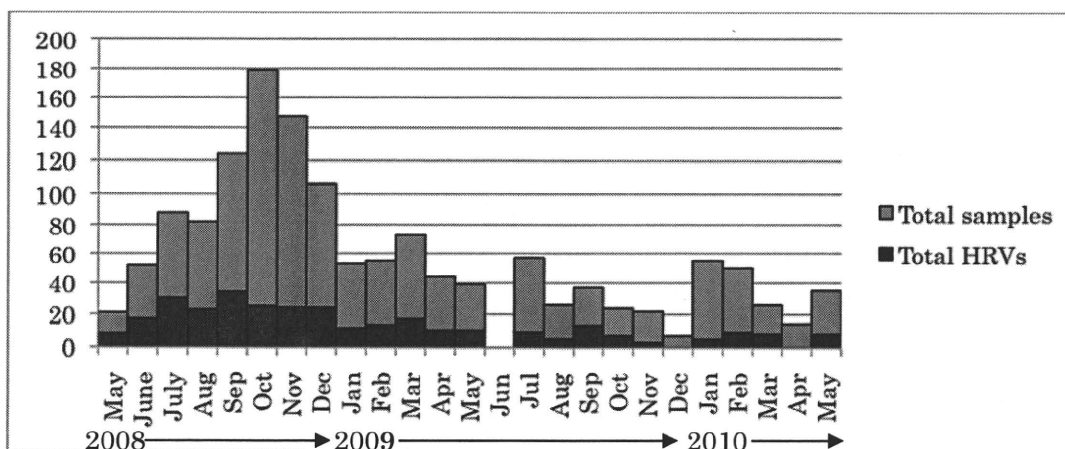


図1 研究期間中の検体数およびライノウイルス検出数の推移

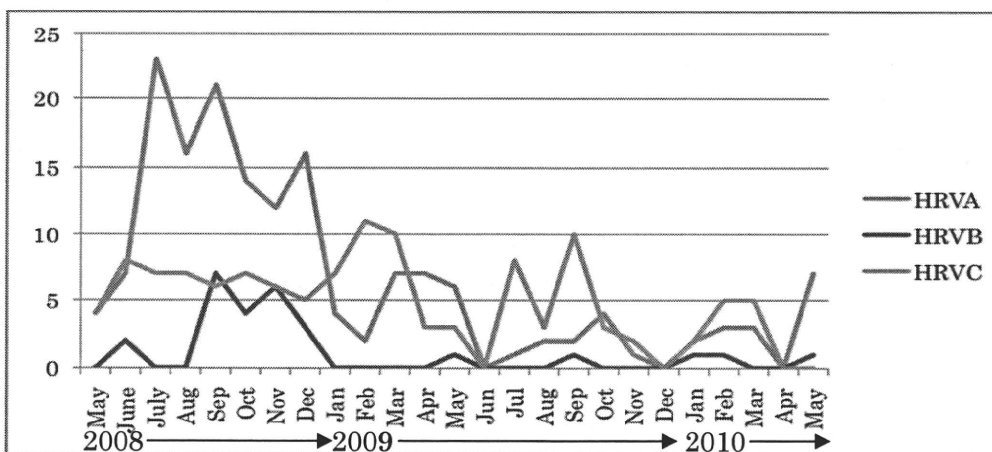


図2 研究期間中のA型、B型およびC型ライノウイルス検出数の推移

臨床像を見ると、BおよびC型で喘鳴を呈する傾向が見られた。

5' UTR および VP4 領域で系統樹を作成したところ、A型は13系統、B型は1系統、C型は13系統に分類された。系統にわけて患者情報を解析したところ、系統間で年齢、喘鳴の有無、SpO₂の値には有意な差はみられなかった。6系統で死亡例が確認され、死亡数は系統間で有意に ($p < 0.01$) 異なっ

ていた。

D. 考察

熱帯のフィリピンにおいて、小児重症肺炎患者の4分の1からライノウイルスが検出されたことより、ライノウイルスの公衆衛生学的重要性が示唆された。

本研究においては、通年してライノウイルスが検出されていたものの、それぞれサ

ブタイプの流行パターンが異なっていた。
また、臨床像も異なっており、ライノウイルスはサブタイプ毎に異なった疫学パターンをとる事が考えられた。

A型およびC型ライノウイルスは非常に変化に富んでおり、一地域で複数の系統が混在して流行していた。また、同じサブタイプでも、系統樹間で転帰が異なっていた。さらに長期間観察し、ウイルスの変異と流行について解析して行く必要性が示された。

E. 結論

A～C型間で流行様式が異なること、および系統により病原性が異なる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 藤直子、重症呼吸器感染症におけるライノウイルス流行パターンと株間による重症化の比較、第58回ウイルス

学会、2011年11月、徳島

- 鈴木陽、Circulation pattern of human rhinoviruses and comparison of severity between genetic types among children with severe pneumonia in the Philippine、Pediatric Infectious Diseases Society of the Philippines、2012年2月、フィリピン・マニラ

G. 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

分担研究報告書

**Respiratory syncytial virus (RSV) F,G タンパクを発現する
組換え麻疹ワクチン AIK-C 株の免疫原性**

研究分担者 中山哲夫 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I

【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株を生ワクチンウイルスベクターとして利用し、Respiratory syncytial virus (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)を作成しMVAIK/RSV/F 免疫後にはsubgroup A, Bに対する高い中和抗体が誘導されることを2010年までに明らかとした。本年度はコットンラットに免疫しRSV subgroup A, Bでchallengeし感染防御能を検討した。MVAIK/RSV-Fで免疫後homo subgroup Aの感染を防御し感染性ウイルスは検出できなかったがhetero subgroup Bのchallengeに対する感染防御は不十分であった。組織学的所見もMVAIK/RSV-Fで免疫した後では間質性肺炎の所見は極めて軽度であった。Subgroup BのFタンパクを導入する必要がある。

A. 研究目的

麻疹ワクチン AIK-C 株弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用し 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成しコットンラットに接種し16 週までの抗体持続能を検討し、RSV subgroup A の遺伝子を導入しており、MVAIK/RSV/G では中和抗体の抗体価は低く持続期間も短いこと、異なる subgroup B に対する交叉免疫原性がないことが明らかとなった。一方 MVAIK/RSV/F は高い中和抗体を誘導し16 週にわたって抗体は持続しており subgroup B に対する交叉免疫活性を示し同様に長期間持続していることを報告した。本年度は MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F で免疫し5 週後に RSV subgroup A, B で Challenge して感染防御能、肺の組織学的所見を検討した。

B.研究方法

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、P/M junction 部位に導入し、RSV F、

G タンパク遺伝子を導入した cDNA から感染性ウイルス MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F を回収した。

2) 7 週齢メスのコットンラットに MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F を感染させ 10 日後の組織からウイルス分離と遺伝子の検出を試みた。

3) 7 週齢メスのコットンラットに組換え麻疹ウイルス $10^{6.0}$ PFU のウイルス液を筋注し、5 週で $10^{6.0}$ PFU の Subgroup A, B ウイルスをインフルラン麻酔下で経鼻感染させ、4 日後の鼻咽頭拭い液、肺胞洗浄液、肺ホモジネートからウイルス分離をおこなった。肺組織切片の HE 染色、RSV N, P, F タンパクに対するモノクローナル抗体ブレンドを用いて免疫組織染色を行った。

C. 結果

1)MVAIK/RSV/G, RSV/F 接種後のウイルスの検出

MVAIK、MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F をコットンラットに接種し脳、脊髄、肺、胸腺、肝、腎、骨髄を採取しホモジネートから感染性ウイルスの検出を試みたが感染性ウイルスは分離できなかった。ランダムヘキサマー、Poly T プライマ

一で cDNA を合成し、麻疹ウイルス N 遺伝子の検出を行った。感染後の胸腺からのみ麻疹ウイルス遺伝子が検出された。

2) 感染防御能

MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F で免疫 5 週に $10^{6.0}$ PFU の Subgroup A、B で Challenge した。ウイルス challenge して 4 日後の鼻咽頭拭い液、肺洗浄液、肺組織からウイルス分離を試みた。鼻咽頭拭い液、肺洗浄液からは感染性ウイルスは検出できなかった。RSV N 遺伝子の RSV subgroup 特異的 real time PCR プライマーを設定した。設定したプライマーは同等の感受性を示し、鼻咽頭拭い液、肺洗浄液からは同程度の遺伝子が検出された。

肺ホモジネートからのウイルス分離の結果を図 1 に示した。

2-1 homo subgroup A challenge

RSV challenge 2 日前にシナジスを投与したコットンラット 3 頭からはウイルスは検出されなかった。MVAIK/RSV/F 免疫後の homo subgroup A で challenge したコットンラットからは感染性ウイルスは検出されなかった。MV/RSV/G で免疫後 RSV subgroup A challenge で分離される感染性ウイルスは RSV 感染の 1/10 に低下するが感染防御能は不十分であった。

2-2 MV/RSV/G の感染防御能

MV/RSV/G で免疫後を homo subgroup A で Challenge したコットンラットで感染性ウイルスは非免疫ラットからの感染モデルの 1/10 に減少したが、RSV subgroup B に対する感染防御能は認められなかった。

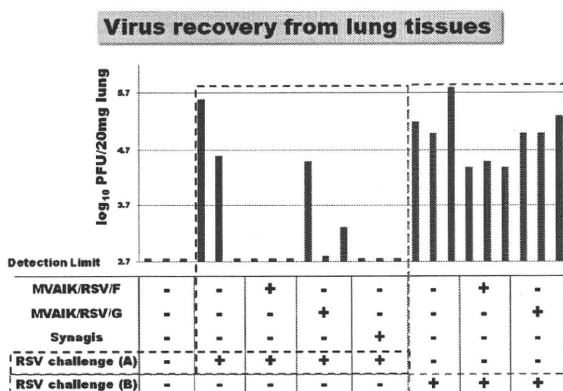
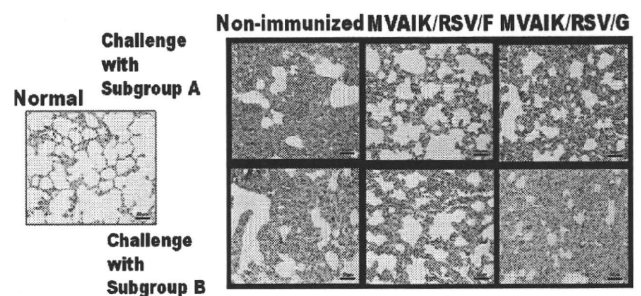


図1. RSV subgroup A、B Challenge

3) 肺組織の HE 染色

非免疫ラットに RSV subgroup A、B を感染させ HE 染色の結果を図 2 に示した。感染ラットでは肺胞隔壁の肥大、炎症細胞の浸潤を認め間質性肺炎の所見を認める。MVAIK/RSV/F で免疫後の Challenge では肺胞構造は保たれており RSV subgroup A challenge 後の所見は RSV subgroup B の challenge 後と比較して軽度であった。

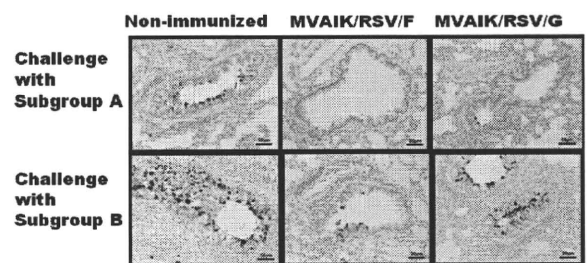
MVAIK/RSV/G 免疫後では subgroup A、B の challenge 後いずれも肺胞構造は保たれてなく間質性肺炎の所見は感染ラットと同程度であった。



4) 肺組織の RSV 免疫染色

非免疫ラットに RSV subgroup A、B を感染させ細気管支の免疫染色を図 3 に示した。非免疫感染ラットの気管支粘膜上皮細胞に RSV 抗原が検出された。MVAIK/RSV/F で免疫後の subgroup A、B Challenge では RSV 抗原の発現している細胞は減少し RSV の肺への感染は抑えられていた。

MVAIK/RSV/G 免疫群で subgroup A、B で challenge 後 RSV 抗原の発現している感染細胞は非免疫群と比較して若干少なくなっていたが感染防御能は不十分であった。



D. 考案

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 3 週から検出され 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る。

RSV subgroup A の遺伝子を導入しておりいずれの組換えウイルスでも subgroup A に対する中和抗体は誘導し、MVAIK/RSV/F は subgroup B に対する交叉免疫活性を示し同様に長期間持続しているが MVAIK/RSV/G では中和抗体の抗体価は低く持続期間も短いこと、異なる subgroup に対する交叉免疫原性が低いことが明らかとしている。

今年度は MVAIK/RSV/F、MV/RSV/G で免疫後 RSV subgroup A、B で challenge し感染防御能を検討した。Homo subgroup A で Challenge したコットラットからは感染性ウイルスは検出されなかった。また、病理学的にも間質性肺炎の所見は極めて軽微であった。一方、MV/RSV/G で免疫後 RSV subgroup A challenge で分離される感染性ウイルスは RSV 感染の 1/10 に低下するが感染防御能は不十分であった。Subgroup B の challenge では感染防御効果は認められなかった。

MVAIK/RSV/F 免疫ではシナジスと同等の感染防御能を示したが、hetero subgroup B に対する感染防御能は十分とは言いがたく subgroup B の Fタンパク遺伝子を導入し2価ワクチンの検討が必要を思われる。

E. 結論

MVAIK/RSV/Fは高い交叉免疫能を有する中和抗体を誘導し RSV の感染を抑えた。しかし異なる Subgroup B に対して感染防御効果は十分ではなかった。

F. 研究発表

1 論文発表 関連論文

- 1) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama I. Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. Vaccine 28: 7626-7633, 2010
- 2) Sakata M, Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the

temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. Vaccine 29: 1107-1113, 2011

- 3) Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. Vaccine 29: 1481-1490, 2011

G. 知的財産の出願、登録状況 なし