

201028033A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の  
解析に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 信澤枝里  
平成 23(2011)年 3 月

## 目 次

平成 22 年度

- I 総括研究報告書
  - 新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究 P. 1  
研究代表者：信澤枝里
  
- II 分担研究報告書
  - 1. 新型インフルエンザウイルス 2009 の受容体構造の解析 P. 14  
研究代表者：信澤枝里  
研究協力者：鈴木忠樹 飛梅 実 鈴木良夫
  
  - 2. 病原性及び重症化要因の解析-気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析 P. 17  
研究分担者：長谷川秀樹  
研究協力者：相内 章 鈴木忠樹 佐藤由子 小杉恒裕 千葉 丈
  
  - 3. 新型インフルエンザウイルスを認識するモノクローナル抗体の作製 P. 26  
研究分担者：高橋宜聖  
協力研究者：小野寺大志 阿戸 学 小林和夫 築地 信
  
  - 4. 新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究 P. 30  
研究分担者：高下恵美
  
  - 5. ヒト抗体による新型ウイルス抗原認識領域の解析 P. 34  
研究分担者：中内美名
  
  - 6. 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析 P. 37  
分担研究者：西村秀一
  
  - 7. インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究 P. 42  
研究分担者：田中成典  
協力研究者：福澤 薫 尾曲克己 吉岡彬生 牛尾律子
  
  - 8. 新型インフルエンザ H1N1 の HA 分子の抗原構造の解析 P. 45  
研究分担者：松寄葉子  
協力研究者：菅原勘悦
  
- III 研究成果の刊行に関する一覧表 P. 50

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

研究代表者 信澤枝里（国立感染症研究所 室長）

**研究要旨** 新型インフルエンザウイルス 2009(新型ウイルス)の病原性および抗原性に関し、網羅的解析を行った。

新型ウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環として気管支喘息モデル動物 NC/Nga マウスにおける新型インフルエンザウイルス感染の病理学的検討を行った。その結果、OVA-Alum を用いた気管支喘息モデルにおける気管支周囲の好酸球浸潤に比べると新型ウイルス感染による好酸球浸潤はごく軽度であり、アレルギー素因を有するマウスにおいても新型ウイルス感染のみでは気管支喘息は惹起されないと考えられた。また、新型ウイルスの病原性は、季節性のインフルエンザウイルスと同程度と言われているが、季節性ウイルスに比し、肺炎重症例が多い。ウイルスの増殖性と受容体分布との関連を明らかにするため、ヒトの気道から肺にかけてのシアリル糖鎖の糖鎖配列を解析した。

新型ウイルスは従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1（季節性ウイルス）とは抗原性が異なり、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さない。しかし、新型ウイルスが惹起する抗ヘマグルチニン（HA）抗体のエピトープ構造の詳細は明らかにされていない。新型ウイルス HA の抗原構造の詳細を明らかにし、新型ウイルス感染およびワクチン接種によりヒトで惹起される抗体の抗原認識機構を解明するため下記の研究を行った。1. 新型ウイルス A/Narita/01/2009 に対する 14 種類のマウス単クローン抗体のエスケープ変異株 140 株を解析した。その結果、9 種類の抗体が Sa 領域を認識し、さらにこのうち 3 種類が Sb 領域をも認識しており、新型ウイルスの Sa, Sb 領域が 1 つの領域を形成する事が示唆された。2. ヒトの新型ウイルス HA に対する免疫応答（中和に関わる HA 上のアミノ酸配列、季節性ウイルスとの交叉反応性等）を明らかにするため、ワクチン接種者から HA を認識する記憶 B 細胞を単離・同定する技術及び抗体遺伝子からモノクローナル抗体を作成する系を構築した。3. ヒト血清中の主要な中和抗体が認識する新型ウイルス HA 上の抗原領域を明らかにする系を構築した。84 名分のワクチン接種前後のペア血清を用いて新型ウイルス HA に対する結合能を解析した結果、ワクチン接種後に新型ウイルス HA 特異的抗体が惹起されたグループの大半が Sa 領域を認識していた。4. 新型ウイルスと季節性インフルエンザウイルスに対するヒト抗

体の交叉反応性に関し、抗 NA 抗体の交叉反応性を解析する系を構築した。5. 新型ウイルス感染およびワクチン接種に関し、血清疫学的研究を行った結果、ワクチン接種では、約 8 割の接種者が防御レベルの 1:40 以上の抗体価を獲得するが、残り 2 割は 2 回接種後もほとんど上昇が認められなかった。また、ウイルス感染においては、小児では短期間における新型ウイルス再感染が示唆された。6. 分子動力学及びフラグメント分子気道法を用いた高精度計算機シミュレーションにより、HA と結合する分子との分子間相互作用の定量的解析法を確立した。

#### 研究分担者

信澤枝里	国立感染症研究所	室長
長谷川秀樹	国立感染症研究所	室長
高橋宜聖	国立感染症研究所	室長
高下恵美	国立感染症研究所	主任研究官
中内美名	国立感染症研究所	研究員
西村秀一	国立病院機構仙台医療センター	室長
田中成典	神戸大学	教授
松壽葉子	山形大学	准教授

#### A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス 2009 (新型ウイルス) の病原性は、季節性ウイルスと同程度であったこともあり、過去のパンデミックの中では、死者の数は最も少なかった。しかし、病原性に関しては、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向がある、また、肺炎重症例が多いなど、季節性インフルエンザウイルス H1N1 (季節性ウイルス) とは異なる特徴が報告されている。

一方、新型ウイルスは、主要抗原 HA がクラシカルプタインフルエンザウイルス H1N1

に由来し、従来の季節性ウイルスとは抗原性が異なり、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さない。一方、ワクチン接種後の高い陽転率を考慮すると、季節性ウイルス感染あるいはワクチン接種によるプライミング効果の可能性も考えられる。しかし、その免疫応答の詳細は明らかではない。今後の抗原変異に対応するためにも、新型ウイルスの抗原構造とそれに対するヒトの免疫応答機構を正しく理解する事は重要である。

本研究では、新型ウイルスに特徴的な病原性解明の一手段として、1. 気管支喘息モデル動物を用いて、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明すること、2. ヒトの呼吸器系組織上の受容体分布を明らかにし、肺炎重症化とウイルス受容体の分布との関連を明らかにすることを目的とした。

一方、新型ウイルスの抗原性解明のため、1. マウス単クローン抗体エスケープ変異株の解析、2. 新型ウイルス感染あるいはワクチン接種後のヒト中和抗体 (モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体) が認識する抗原領域の同定、3. 血清疫学的研究により、新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解明

を行うことを目的とした。さらに新型コロナウイルスの今後の変異予測を可能にするため、計算機実験により新型コロナウイルスの抗原抗体反応、受容体との結合能に関わる HA 上の重要なアミノ酸残基の定量化を行った。

## B. 研究方法

### ●病原性の解析

・BALB/c および気管支喘息モデルマウス NC/Nga に PR8 株及びマウスに馴化した新型コロナウイルス A/Narita/1/2009 を感染させ、新型コロナウイルス感染による症状の増悪化を検討した。

・剖検検体 3 名からの鼻腔粘膜、咽頭粘膜、気管粘膜、肺の組織を用いて三次元糖鎖マップ法で HPLC による N 型糖鎖の解析を行った。

### ●抗原性の解析

○抗原構造の解析：  
新型コロナウイルス A/Narita/1/2009HA に対するマウス単クローン抗体エスケープ変異株の解析により、新型コロナウイルス HA 上の詳細な抗原構造を同定した。

○ヒト抗体による新型コロナウイルス抗原構造認識機構の解析：  
・ワクチン接種者の記憶 B 細胞から抗体遺伝子のクローニングを行い、培養細胞上で抗体蛋白を発現させる系を開発した。

・新型コロナウイルスワクチン接種者のペア血清を新型コロナウイルス HA 及びキメラ HA 発現細胞と反応させ、血清抗体が認識するウイルス抗原上の領域を同定した。

・新型コロナウイルスワクチン接種者及び感染者の

ペア血清を用いて HI 試験および放射免疫沈降法による抗体価の測定を行った。

・分子動力学法ならびにフラグメント分子軌道法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、蛋白質内の全アミノ酸の相互作用に関する網羅的・系統的な解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いた感染実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。ヒト由来試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### (1)気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

8 週齢の BALB/c マウスおよび NC/Nga マウスにインフルエンザ H1N1 ウイルス PR8 株、新型コロナウイルス Narita 株を経鼻接種し、病理学的検索を行った。接種 3、7 日目に病理学的検索を行ったところ、BALB/c マウスでは、接種 3、7 日目に肺胞上皮に PR8 株、Narita 株のウイルス抗原が検出され、7 日目には軽度の好酸球を混じる炎症細胞浸潤を伴った。NC/Nga マウスでは、接種 3 日目に肺胞上皮に PR8 株、Narita 株のウイルス抗原が検出されたが、接種 7 日目には Narita 株のみがウイルス抗原陽性であり、Narita 株では軽度の好酸球浸潤を伴う炎症細胞浸潤が認められた。OVA-Alum を用いた気管支喘息モデルにおける気管支周囲の好酸球浸潤に比

べると新型コロナウイルス感染による好酸球浸潤はごく軽度であった。

## (2)新型コロナウイルスの受容体構造の解析

ヒト組織、鼻腔粘膜、肺、咽頭粘膜、気管粘膜におけるN型糖鎖の解析を行った。各組織における糖鎖の分布は50~70%が中性糖で最も多く、シアリル化糖では、モノシアリル化およびジシアリル化糖が、残りの大半を占めた。モノシアリル化糖およびジシアリル化糖は組織により分布の違いが見られた。

## (3)新型コロナウイルス HA 分子上の抗原構造の解析

新型コロナウイルスに対する中和抗体が認識するエピトープの同定を行った。A/Narita/1/2009株に対する18種類のマウス単クローン抗体を親株と反応させ、エスケープ変異株を分離した。その結果、14種類の抗体に対するエスケープ変異株では、既知の抗原領域のSa、Sb、Ca1領域に置換があった。なかでも、Sa領域を認識する抗体が14種類中9種類あり、この領域が主要な領域である可能性を示唆した。また、このうちの3種類は、Sb領域にもアミノ酸置換をもち、新型コロナウイルスH1HAではSa領域とSb領域が1つの領域を形成している可能性を示唆した。

## (4)ヒトの血清抗体が認識する新型コロナウイルス抗原上の抗原構造の解析

◎新型コロナウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

ワクチン接種前後の末梢血単核球を用いて、新型コロナウイルスHAに結合する記憶B細胞をフローサイトメトリにより選別した。その結果、

ワクチン接種後約1ヶ月では、HAに結合する記憶B細胞の数が、接種前に比べて増加する事が判明した。ヒト抗体遺伝子クローニングシステムを用い、HA結合性記憶B細胞の発現する抗体遺伝子の増幅ならびにクローニングを試みた。その結果、これまで一人のドナーから6ペアのV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>遺伝子をクローニングすることに成功した。クローニングに成功したV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>遺伝子をHEK293細胞に形質転換し、5日後に培養上清を回収した。培養上清に含まれる抗体の濃度、HA結合性をELISAにより検証したところ、HAに結合する抗体タンパクの産生が確認された。

◎ヒト(ポリクローナル)抗体による新型コロナウイルス抗原認識領域の解析

新型コロナウイルスワクチン接種者のペア血清(84名分)を用いて、血清抗体が認識するHA上の領域を同定した。新型コロナウイルスA/Narita/1/2009株(Narita)HAおよびA/WSN/33株(WSN)HA間で作製したキメラHAに対する抗体の結合能を測定した結果、新型コロナウイルスワクチン接種によりNaritaHA1領域に特異的に結合する抗体が惹起されたのは17名で、NaritaHA1およびWSNHA1の両方に対して結合能を示したのは、26名であった。また、NaritaHA1に特異的に結合する抗体の多くが抗原領域Sa領域を認識していた。

新型コロナウイルスワクチン接種者および感染者の血中抗体のうち抗NA抗体の影響を調べるため、NA活性阻害効果を指標とする新たな実験系の構築を行った。

## (5)新型コロナウイルスに対するヒトの免疫応答の

## 血清疫学的解析

独立した3医療機関でそれぞれ約100名を対象とし、新型インフルエンザワクチン接種者の血清を用いたHI試験を行った。その結果、各医療機関で約80%の対象者は、接種前に比べ接種後のHI価が4倍以上増加していた。しかし、残りの20%は、2回目のワクチン接種でも陽転率は約30%であった。

一方、感染における免疫応答を調べる研究の一環として、小児における再感染事例を検討した。17例の再感染例のうち、2回目感染時にウイルス分離陽性となった9例では、一度目の感染時、HI価の上昇が $\leq 10$ であったが、このうち4例では放射免疫沈降法で、新型HAに特異的な非常に弱いシグナルが確認できた。

### (6)HAタンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

HIHAと受容体との結合に重要と考えられる190, 225, 226番目のアミノ酸に対し、アラニン・スキヤニングおよび変異導入を行い、各アミノ酸残基の重要性の定量化を行った。また、新型ウイルスHAのLys145が受容体との結合に重要な役割を果たすことをFMO法によっても証明した。

新型ウイルスHAを含むHIHAとヒト抗体の複合体構造に対し、結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認した。

## D. 考察

### (1)気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルである

NC/NgaマウスとBALB/cマウスにマウスに馴化させたH1N1亜型インフルエンザウイルスであるPR8株とNarita株を感染させた。接種後、7日目においては、BALB/cマウスではいずれの株でも、NC/NgaマウスではNarita株で、軽度ではあるがアレルギーの重要な指標である好酸球浸潤が認められた。しかしながら、一般的に気管支喘息モデルとして用いられているOVA-Alumの系で認められるような高度の好酸球浸潤は、いずれの感染実験においても認められず、アレルギー素因を有するマウスにおいても新型インフルエンザウイルス感染のみでは気管支喘息は惹起されないと考えられた。今後は、喘息患者でのインフルエンザ重症化のマウスモデルを構築するために、NC/Ngaマウスなどのアレルギー素因のあるマウスにOVAなどで気管支喘息を誘発した後に、PR8株、Narita株を感染させることで、どのような病態が生じるかを病理学的に解析する必要があると考えられる。

### (2)新型ウイルスの受容体構造の解析

剖検検体の各組織における糖鎖の分布は、鼻腔、咽頭と気管、肺とでは、モノシリアル糖鎖およびジシリアル糖鎖の分布に多少の違いが見られた。しかし、各分画内糖鎖の種類に関しては、現時点では個体間による大きな相違は確認されていない。今後、シアル酸の種類と同定を行い新型ウイルスの糖鎖に対する親和性との関連を明らかにしていく予定である。

### (3)新型ウイルスHA分子上の抗原構造の解

析

現時点では、単クローン抗体エスケープ変異株のアミノ酸置換部位の解析結果からは、中和抗体が認識する抗原領域は Sa, Sb, Ca1 だった。このうち、Sa 領域を認識する抗体が半数以上で、この領域が主要な抗原領域であることを示唆する。また、新型ウイルスでは Sa, Sb 領域が一つの領域を形成している可能性があった。各エスケープ変異株と 18 種類の単クローン抗体との反応性を解析し、抗原地図を作成し、季節性インフルエンザ HIHA との抗原構造の相違を明らかにする。

#### (4)ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

本研究では、新型インフルエンザウイルス HA に結合する記憶 B 細胞の新しい単離技術を開発し、これと抗体遺伝子のクローニング技術を組み合わせる事によって、新型インフルエンザウイルス HA に結合するモノクローナル抗体の迅速な作製システムを構築する事に成功した。今後、ワクチン接種歴、インフルエンザ感染履歴の異なる様々なグループのドナーからモノクローナル抗体を作製し、その結合性解析に役立てていきたいと考えている。

新型ウイルスワクチン接種者のペア血清とキメラ HA との結合反応の結果、ワクチン接種後、(i)Narita HA1 に特異的に結合する抗体が産生される集団、(ii)Narita HA1 および WSNHA1 両方に結合する抗体が産生される集団、(iii)ワクチン接種前から NaritaHA1 および WSNHA1 に結合する抗体が存在し、ワクチン接種により変化が見られない集団が

存在することが示された。新型ウイルス特異的結合抗体は、主に Sa 領域に結合したが、その詳細はさらに解析する。また、ワクチン接種後 WSN のどこに対する抗体が上昇したのかも明らかにし、新型ウイルス感染により HA の配列保存領域に対する抗体が上昇するという現象との関連を調べる。

#### (5)新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

成人のワクチン接種者で HI 抗体価が上昇しない集団の存在が明らかとなったが、その理由が季節性ウイルス感染、ワクチン接種によるプライミング効果と関連するのか、中和抗体は上昇しているのか等、理由を解明し、そのような集団への免疫方法を模索する必要がある。

小児の再感染事例は、成人のワクチン接種後抗体上昇率が低い集団と同じ理由なのか、初回感染で抗体価が上昇しなかった理由を検討し、そのような集団への免疫方法を模索する必要がある。

#### (6)HA タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

今後、新型ウイルス感染重症化に関連するような、受容体との親和性、結合能に強く関わる重要アミノ酸残基の特定を行っていく必要がある。特に、当該班で行っているヒトの組織上の受容体構造の詳細が明らかになった時点で、具体的なアミノ酸残基の特定を行っていく予定である。

新型ウイルス HA と抗体との認識結合に関しても、マウスおよびヒト抗体が認識するアミノ酸残基の詳細が、当該班で明らかにさ



れてきたので、結合にかかわる重要アミノ酸残基の特定を行っていく。

一方、計算機シミュレーションの高精度化を目指すと同時に、病原性に関わる HA 以外のタンパク質の解析を行うことも今後の課題とする。

## E. 結論

●アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いた感染実験から、新型ウイルス感染のみでは気管支喘息は惹起されにくいことが示唆された。

●ヒト剖検検体由来の鼻粘膜、咽頭粘膜、気管粘膜、肺組織における N 型糖鎖の分布は、50～70%が中性糖で残りの大半がモノシアル化糖およびジシアル化糖で組織により分布に違いが見られた。

●A/Narita/1/2009 に対する単クローン抗体のうち、HA に結合する抗体の大半は、Sa、Sb 領域を認識した。

●新型ウイルス HA に結合するヒト記憶 B 細胞を分離し、その抗体遺伝子から単クローン抗体を作製することに成功した。

●新型ウイルスワクチン接種者の血清抗体のうち、新型ウイルス HA に特異的に反応する抗体の大半は Sa 領域を認識しており、この点は、マウス単クローン抗体の反応性と合致する。

●新型ウイルスワクチン接種および感染により惹起される抗体の HI 抗体価が低い集団の存在が明らかになった。

●分子動力学 (MD) 法とフラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いた高精度計算機シミ

ュレーションを行うことで、HA タンパク質に関わる分子間相互作用の定量的な解析が可能となった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

### 1. 論文発表

1. Fukuzawa K, Omagari K, Nakajima K, Nobusawa E, and Tanaka S. The Sialic Acid Recognition of the Human Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus (2009/H1N1pdm): Quantum Mechanical FMO Calculations for the Binding Mechanism between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin. *Protein Peptide Lett.* 2011), in press
2. Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzuki 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, Aina 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]
  6. Nakashima, H., Hamaguchi, Y., Watanabe, R., Ishiura, N., Kuwano, Y., Okochi, H., Takahashi, Y., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., Fujimoto, M. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J. Immunol.*, 184, 4637-4645, 2010
  7. Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K., Moriyama, S., Takahashi, Y. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237, 104-116, 2010
  8. Yuki, N., Takahashi, Y., Ihara, T., Ito, S., Nakajima, T., Funakoshi, K., Furukawa, K., Kobayashi, K., Odaka, M. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. *J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry* Nov 7. [Epub ahead of print] 2010
  9. Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H. Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus. *BMC Infect.Dis*. 10:170, 2010.
  10. Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, 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, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan. *PLoS One*. 5:e11057, 2010.
  11. Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y. Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults. *J.Med.Virol*. 82:2092-2096, 2010.
  12. Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S. Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J.Virol*. 85:1322-1329, 2011.
  13. Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa A, Asano Y, Ihira M, Tashiro M, Kageyama T. Evaluation of reverse

- transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, 83(1):10-5, 2011
14. Nakauchi M, Yasui Y, Miyoshi T, Minagawa H, Tanaka T, Tashiro M, Kageyama T. One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *Journal of Virological Methods*. 171(1):156-62, 2011
  15. Y. Mochizuki, K. Yamashita, K. Fukuzawa, K. Takematsu, H. Watanabe, N. Taguchi, Y. Okiyama, M. Tsuboi, T. Nakano, and S. Tanaka: Large-Scale FMO-MP3 Calculations on the Surface Proteins of Influenza Virus, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) *Chem. Phys. Lett.* 493 346-352 2010
  16. 田中成典 インフルエンザウイルスの分子シミュレーション アンサンブル 12 27-30 2010
  17. 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. *Virol J* 7(1):53, 2010..
  18. Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Mizuta K, Itagaki T, Nishimura H, Matsuzaki Y: Development and evaluation of a whole virus-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human metapneumovirus antibodies in human sera. *J Virol Methods* 164(1-2):24-29, 2010.
  19. Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y: Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *J Hosp Infect* 75(1):42-46, 2010.
  20. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Endemicity of human metapneumovirus subgenogroups A2 and B2 in Yamagata, Japan, between 2004 and 2009. *Microbiol Immunol* 54(10):634-638, 2010.
  21. Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S: Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J Virol* 84(4):1957-1966, 2010.
- 2.学会発表
1. 信澤枝里、中島捷久、尾曲克己、中島節子 インフルエンザウイルス抗原変異出現のメカニズム 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
  2. 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
3. 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
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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- $\gamma$  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
  11. 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
  12. 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、福士秀悦、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症を起こ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
13. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代眞人、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
  14. 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
  15. 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
  16. 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、田代眞人、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
  17. 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
  18. 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、田代眞人、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
  19. 高橋宜聖 「Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs」(ア) 千葉大 G-COE シンポジウム、東京、2010 年 12 月
  20. 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、氏家誠、小淵正次、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2009/10 シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性 pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月.
  21. 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、網康至、須崎百合子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小淵正次、氏家誠、田代眞人、小田切孝人、全国地方衛生研究所：2009/10 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 22 年度のワクチン株. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月.
  22. 中内美名、高山郁代、高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、氏家誠、小淵正次、大場邦弘、許斐奈美、小田切孝人、田代眞人、影山努、全国地方衛生研究所：A/H1N1pdm タミフル耐性株の迅速検出法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月.

23. 西村秀一 新型インフルエンザ流行中の同一患者での再感染について 第20回日本外来小児科学会(2010年8月福岡市)
24. 吉岡彬生、栗崎以久男、渡邊博文、田中成典：「分子動力学シミュレーションによるインフルエンザウイルス NSI タンパク質と dsRNA の結合解析」 日本コンピュータ化学会 2010 春季年会、2010 年 5 月 21 日、東京
25. 田中成典：「スーパーコンピュータでインフルエンザウイルスの変異の仕組みを探る」地球シミュレータ産業利用シンポジウム 2010、2010 年 10 月 8 日、東京
26. 田中成典：「フラグメント分子軌道法を用いた薬剤耐性メカニズムの解析」平成 22 年度地球シミュレータ利用報告会、2011 年 2 月 4 日、横浜
27. 松嵩葉子、板垣勉、勝島史夫、勝島由利子、永井幸夫：迅速診断キットで診断したヒトメタニューモウイルス感染症の臨床像とウイルス量の推移。第 113 回日本小児科学会学術集会、盛岡；2010 年 4 月
28. 松嵩葉子：地衛研と感染症臨床との連携。第 39 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京；2010 年 10 月
29. 板垣勉、松嵩葉子：1 歳未満児のヒトメタニューモウイルス (hMPV) 感染症。第 42 回日本小児感染症学会、仙台；2010 年 11 月
30. Nobusawa E, Nakajima K, Omagari K, Nakajima S. Mechanism for Selection of Antigenic Variants in the Presence of Human Sera. Options for the Control of Influenza VII Sep 3-7, 2010 Hong Kong SAR, China.
31. Shirakura M, Nobusawa E, Asanuma H, Kishida N, Ainai A, Iwata N, Nagata N, Hasegawa H, Kageyama T, Odagiri T, and Tashiro M. Generation of the novel influenza H1N1 vaccine viruses by reverse genetics. Options for the Control of Influenza VII Sep 3-7, 2010 Hong Kong SAR, China.
32. Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E. Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, June 2010
33. 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖 「T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling」第 14 回国際免疫学会、神戸、2010 年 8 月
34. 疋田正喜、加地友弘、高橋宜聖、Klaus Rajewsky、竹森利忠 「IgG1 memory B cell compartment undergoes qualitative alteration after its initial generation early in the immune response.」第 14 回国際免疫学会、神戸、2010 年 8 月
35. Takashita E, Ujike M, Ejima M, Fujisaki S, Obuchi M, Kim N, Kishida N, Xu H, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Tashiro M, Odagiri T. Detection and characterizations of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses in the 2009/10 season

- in Japan. Options for the Control of Influenza VII, September 2010
36. Nakauchi M, Kageyama T, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Odagiri T, Tashiro M, Oba K, Konomi N, the working group for influenza virus surveillance in Japan. A rapid genotyping of oseltamivir-resistant or -susceptible pandemic A/H1N1 2009 influenza viruses by duplex RT-PCR assay. Options for the Control of Influenza VII, September 2010
37. Kishida N, Xu H, Takashita E, Obuchi M, Fujisaki S, Ujike M, Ito R, Doi T, Sugawara H, Ejima M, Kim N, Ami Y, Suzaki Y, Yamashita K, Yasui Y, Tada Y, Okabe N, Tashiro M, Odagiri T. Characterizations of influenza viruses isolated during the 2009/10 season in Japan and neighboring countries. Options for the Control of Influenza VII, September 2010
38. Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S. The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication. Options for the Control of Influenza VII, September 2010
39. Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K. Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII, September 2010

#### H. 知的財産権の出願・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

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ウイルス 2009 の受容体構造の解析

分担研究者 信澤枝里（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  
第4室 室長）

研究協力者 鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員）  
飛梅 実（国立感染症研究所 感染病理部第二室 主任研究官）  
鈴木良夫（総合病院国保旭中央病院 臨床病理科 部長）

**研究要旨** 新型インフルエンザウイルス 2009（新型ウイルス）の病原性は、季節性のインフルエンザウイルスと同程度と言われているが、季節性ウイルスに比し、肺炎重症例等の重症例の報告が多い。ウイルスの増殖性と受容体分布との関連を明らかにするため、ヒトの気道から肺にかけてのシアリル糖鎖の糖鎖配列を解析した。その結果、咽頭、鼻腔と気管、肺とでは、存在する糖鎖の分岐に一部違いが確認された。

#### A. 研究目的

インフルエンザウイルスの主な受容体はシアリル糖鎖で、ヒトウイルスの受容体とトリウイルスの受容体は、それぞれ、 $\alpha 2-6$  結合シアリル酸と  $\alpha 2-3$  結合シアリル酸である。また、レクチンを用いた手法で、ヒト気道から気管支にかけては、主に  $\alpha 2-6$  結合シアリル酸が、また、細気管支、肺胞などでは  $\alpha 2-3$  結合シアリル酸が分布する事が報告されている。一方、受容体の末端に位置するシアリル酸のみではなく、アシアロ領域の配列が、ウイルスとの結合能に影響する事も報告されている。本研究では、ヒトの鼻腔粘膜、咽頭粘膜、気管粘膜、肺の受容体構造の詳細を解析

し、受容体分布とウイルスの局所的増殖との関連を明らかにし、新型ウイルス感染の重症化に及ぼす影響を明らかにする事を目的とする。今年度は、ヒトの各組織上のシアリル糖鎖構造の解析を行った。

#### B. 研究方法

1. 剖検検体として提供されたヒト組織：鼻腔粘膜、咽頭粘膜、気管粘膜、肺の組織を破碎後、BCA 法で蛋白定量を行った。
2. 各組織から切り出した N 型糖鎖は PA 化ラベルの後、三次元 HPLC マップ法により解析を行った。DEAE カラムにより、中性糖画分とシアリル化糖画分に分離後、シアリル化糖



画分のみ逆相 ODS クロマトグラフィーにより、さらに糖鎖の分離を行った。

(倫理面への配慮) ヒト剖検検体の使用に関しては、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

現時点では、DEAE 解析の結果、中性糖、モノシアル化糖、ジシアル化糖、トリシアル化糖、が検出された。各糖鎖の分布は、検体 1 で鼻腔粘膜、肺、咽頭粘膜に含まれる中性糖、モノシアル化糖、ジシアル化糖、トリシアル化糖の分布は、それぞれ 72.3, 6.9, 18.9, 1.9%, 63.6, 11.2, 23.8, 1.4%, 42.7, 22.3, 31.3, 3.7%であった。検体 2 で鼻腔粘膜、肺、咽頭粘膜、気管粘膜に含まれる中性糖、モノシアル化糖、ジシアル化糖、トリシアル化糖の分布は、54.6, 14.0, 30.0, 1.4%, 42.2, 24.4, 31.8, 1.6%, 72.3, 7.4, 19.2, 1.1%, 46.1, 22.4, 29.9, 1.4% であった。各分画に含まれる糖鎖の種類は、概ね一致していた。

### D. 考察

糖鎖の分布は、鼻腔、咽頭と気管、肺とでは、モノシアル糖鎖およびジシアル糖鎖の分布に多少の違いが見られた。しかし、各分画内糖鎖の種類に関しては、現時点では個体間による大きな相違は確認されていない。今後、シアル酸の種類を同定を行い新型ウイルスの糖鎖に対する親和性との関連を明らかにしていく予定である。また、当該班の分子シミュレーション担当班員による新型ウイ

ルス HA 上の残基と各糖鎖分子との結合力の推定も行っていきたい。

### E. 結論

ヒト剖検検体由来の鼻粘膜、咽頭粘膜、気管粘膜、肺組織における N 型糖鎖の中性糖およびシアル糖鎖の分布を解析した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Fukuzawa K, Omagari K, Nakajima K, Nobusawa E, and Tanaka S. The Sialic Acid Recognition of the Human Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus (2009/H1N1pdm): Quantum Mechanical FMO Calculations for the Binding Mechanism between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin. *Protein Peptide Lett.* 2011), in press

#### 学会発表

1. 信澤枝里、中島捷久、尾曲克己、中島節子  
インフルエンザウイルス抗原変異出現のメカニズム 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
2. 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
3. Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E.

Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, June 2010.

4. Nobusawa E, Nakajima K, Omagari K, Nakajima S. Mechanism for Selection of Antigenic Variants in the Presence of Human Sera. Options for the Control of Influenza VII Sep 3-7, 2010 Hong Kong SAR, China
5. Shirakura M, Nobusawa E, Asanuma H, Kishida N, Ainai A, Iwata N, Nagata N, Hasegawa H, Kageyama T, Odagiri T, and Tashiro M. Generation of the novel influenza H1N1 vaccine viruses by reverse genetics. Options for the Control of Influenza VII Sep 3-7, 2010 Hong Kong SAR, China.

#### H. 知的財産権の出願・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

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

病原性及び重症化要因の解析

—気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析—

分担研究者: 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第六室 室長)

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第六室 研究員)

鈴木忠樹 (国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員)

佐藤由子 (国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官)

小杉恒裕 (東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 修士課程)

千葉 丈 (東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 教授)

**研究要旨:** 新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環として、気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病理学的検討を行った。8 週齢の BALB/c マウスおよび NC/Nga マウスにインフルエンザ H1N1 ウイルス PR8 株、新型インフルエンザ H1N1 ウイルス Narita 株を経鼻接種し、病理学的検索を行った。接種 3、7 日目に病理学的検索を行ったところ、BALB/c マウスでは、接種 3、7 日目に肺胞上皮に PR8 株、Narita 株のウイルス抗原が検出され、7 日目には軽度の好酸球を混じる炎症細胞浸潤を伴った。NC/Nga マウスでは、接種 3 日目に肺胞上皮に PR8 株、Narita 株のウイルス抗原が検出されたが、接種 7 日目には Narita 株のみがウイルス抗原陽性であり、Narita 株では軽度の好酸球浸潤を伴う炎症細胞浸潤が認められた。OVA-Alum を用いた気管支喘息モデルにおける気管支周囲の好酸球浸潤に比べるとインフルエンザウイルス感染による好酸球浸潤はごく軽度であり、アレルギー素因を有するマウスにおいても新型インフルエンザウイルス感染のみでは気管支喘息は惹起されないと考えられた。

#### A. 研究目的

2009 年より流行が始まった新型インフルエンザ (H1N1pdm) では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向があることが指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかになってきた。しかしながら、喘息患者での

インフルエンザ重症化の病因・病態については全く分かっていない。本研究は気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明することを目指した。

気管支喘息モデル動物としては、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスを用いた。この

マウスを用いた OVA 感作気管支喘息モデルでは BALB/c マウスに比べ血中 IgE の上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことが知られており、気管支喘息の良い疾患モデルとして知られている。本年度は、マウスに馴化させた新型インフルエンザウイルス Narita 株をこのマウスに感染させる事により喘息患者でのインフルエンザ重症化のマウスモデルの構築を試みた。

さらに、今後の実験として気管支喘息を発症したマウスモデルでの感染実験を行うために気管支喘息モデルの構築を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 感染実験

8週齢の BALB/c マウスおよび NC/Nga マウスにマウス馴化株である Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))、新型インフルエンザウイルスである Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1))を一匹あたり  $1 \times 10^3$  PFU/20  $\mu$ l (PR8 株では 40 LD<sub>50</sub>、Narita 株では 0.025 LD<sub>50</sub> に相当する) もしくは  $1 \times 10^2$  PFU/20  $\mu$ l (PR8 株では 4 LD<sub>50</sub>、Narita 株では 0.0025 LD<sub>50</sub> に相当する) ケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。Narita 株は BALB/c マウスの肺内にて 15 代継代しマウスに馴化させた株を用いた。接種 3 日目 ( $1 \times 10^3$  PFU 感染群)、7 日目 ( $1 \times 10^2$  PFU 感染群) にこれらの動物 (一群 3 匹) を過麻酔殺、心臓採血した。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。この感染実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

### 2) 気管支喘息モデルの構築

6 週齢の BALB/c マウスに卵白アルブミン

(OVA) 100 $\mu$ g + alum 2mg / 200  $\mu$ l PBS を 1 週間間隔で 3 回腹腔内投与し、さらに 1 週間後に OVA 100 $\mu$ g / 50 $\mu$ l PBS を 3 日間連続経鼻投与した。対照群には PBS のみを投与した。最後の OVA 経鼻投与から 24 時間後にこれらの動物 (一群 2 匹) を過麻酔殺、心臓採血した。その後、臓器を採取し、これら採取した組織材料は 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。この動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

### 3) 病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液固定のインフルエンザウイルス感染マウス組織材料 (脳、鼻腔、気道、肺) は、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗インフルエンザウイルス NPタンパクポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH9.0) (ニチレイ) 中で 121°C 20 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温 30 分で処理し、1 次抗体 (4000 倍稀釈) を加え 4°C で一晩インキュベートした。その後、ENVISION+ (DAKO) を用いてプロトコール通り免疫染色を実施した。

## C. 研究結果

### 1) 感染実験

動物は接種 3 日目もしくは 7 日目では、明らかな立毛、元気消失は見られなかった。解剖時、接種 7 日目の BALB/c マウスでは PR8 株感染、Narita 株感染個体ともに肺の一部に赤褐色調を呈する病変が肉眼的に観察できたが、NC/Nga マウスではい