

ずれの株の感染個体においても肉眼的な病変ははっきりしなかった。接種3日目の病理学的検索の結果、BALB/c マウスにおいてはPR8株感染とNarita株感染いずれの個体においても気道粘膜上皮と肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり、末梢肺においては、リンパ球やマクロファージを主体とした軽度の炎症細胞浸潤を認めた(図1)。NC/Nga マウスでは、PR8株感染ではBALB/cと同様に気道上皮と肺胞上皮でウイルス抗原が陽性となったが、炎症細胞浸潤はほとんど認められなかった。一方、Narita株感染においては、ウイルス抗原は気道上皮に認められず肺胞上皮でのみ陽性であり、ウイルス抗原陽性の肺胞上皮周囲にはリンパ球を主体とした高度の炎症細胞浸潤が認められた(図1)。接種7日目の病理学的検索の結果、BALB/c マウスにおいては、PR8株感染、Narita株感染ともに肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり、その周囲にリンパ球、好中球などの炎症細胞浸潤が認められた。また、軽度の好酸球浸潤も認められた(図2)。一方、NC/Nga マウスにおいてはPR8株感染ではウイルス抗原も炎症反応も認められなかったが、Narita株感染では、肺胞上皮にウイルス抗原が陽性となり周囲にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤が認められ、好酸球の浸潤も散見された(図2)。全体な傾向としてNarita株はPR8株に比べ抗原陽性細胞が乏しく炎症性反応が強かった。さらにこの傾向は、NC/Nga マウスでより顕著であった。(図1, 2)。

## 2) 気管支喘息モデル

喘息患者でのインフルエンザ重症化のモデルとしてはアレルギー素因のある動物への感染実験だけでなく、実際に気管支喘息を惹起した後のインフルエンザウイルス感染の影響も検討する必要がある。本年度はこの実験を行うためにまず気管支喘息モ

デルの構築を試みた。その結果、OVA投与個体では、気管支周囲に著明な好酸球浸潤を伴う高度の炎症細胞浸潤が認められた。この好酸球浸潤は前述のインフルエンザウイルス感染実験で見られた好酸球浸潤に比べ非常に高度であった。

## D. 考察

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。それぞれの株でマウスに対する感受性が異なるが、今回の実験では、ウイルス量を1000 PFUもしくは100PFUにそろえて実験を行っており、病態を単純に比較する事は難しいが、NC/Nga マウスを用いた実験ではNarita株はウイルス抗原陽性細胞の数が少なく炎症反応が強い傾向があった。一方、BALB/c マウスを用いた実験ではこの傾向は不明瞭であった。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。

## E. 結論

アレルギー素因を有する NC/Nga マウス、および BALB/c マウスにおける新型インフルエンザウイルス感染の病態を気管支喘息モデルと比較しながら病理学的に解析した。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

### 4. 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- $\gamma$  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
  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的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
  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

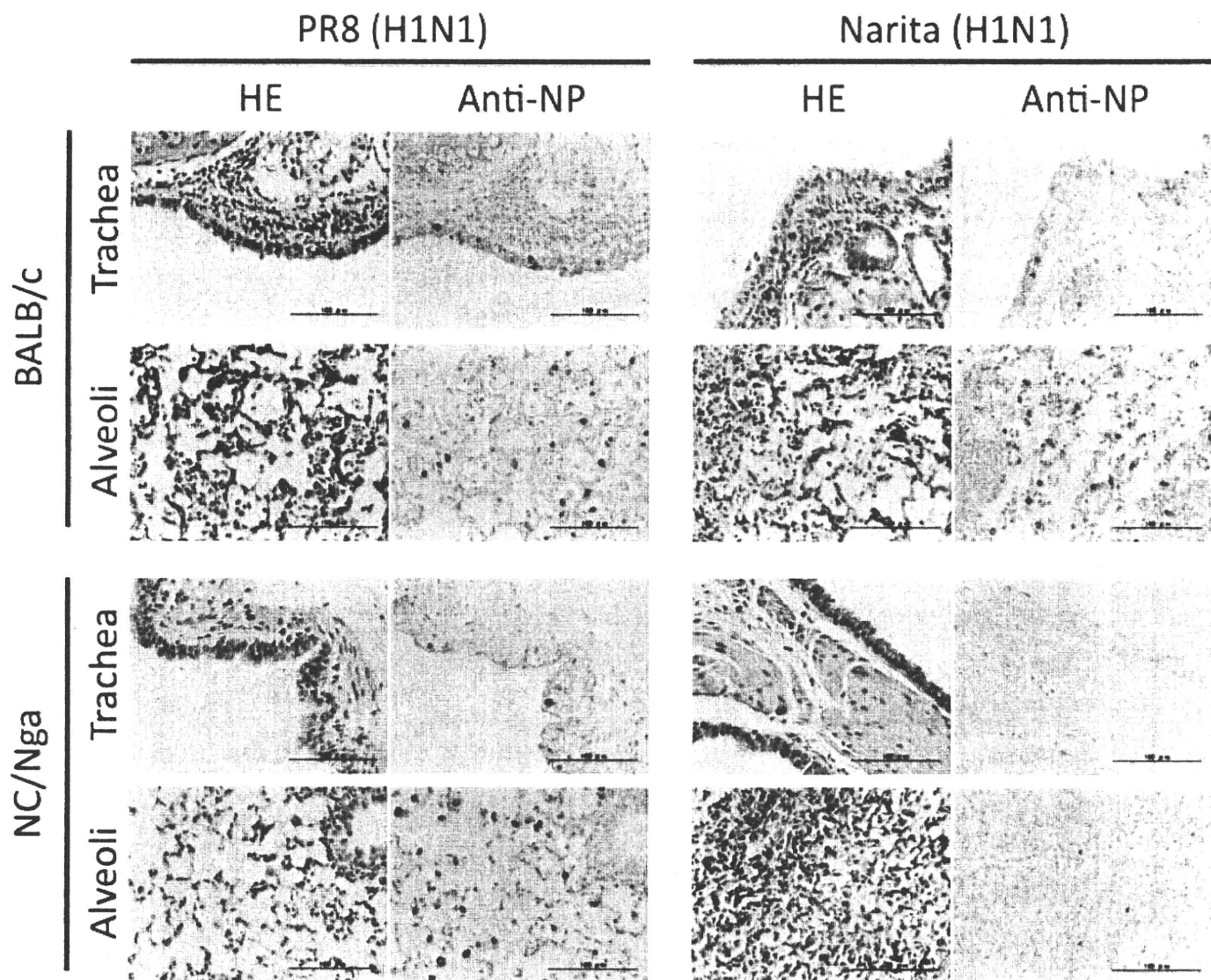


図1 インフルエンザウイルス1000PFU/20 $\mu$ l経鼻接種3日目の病理学的検索

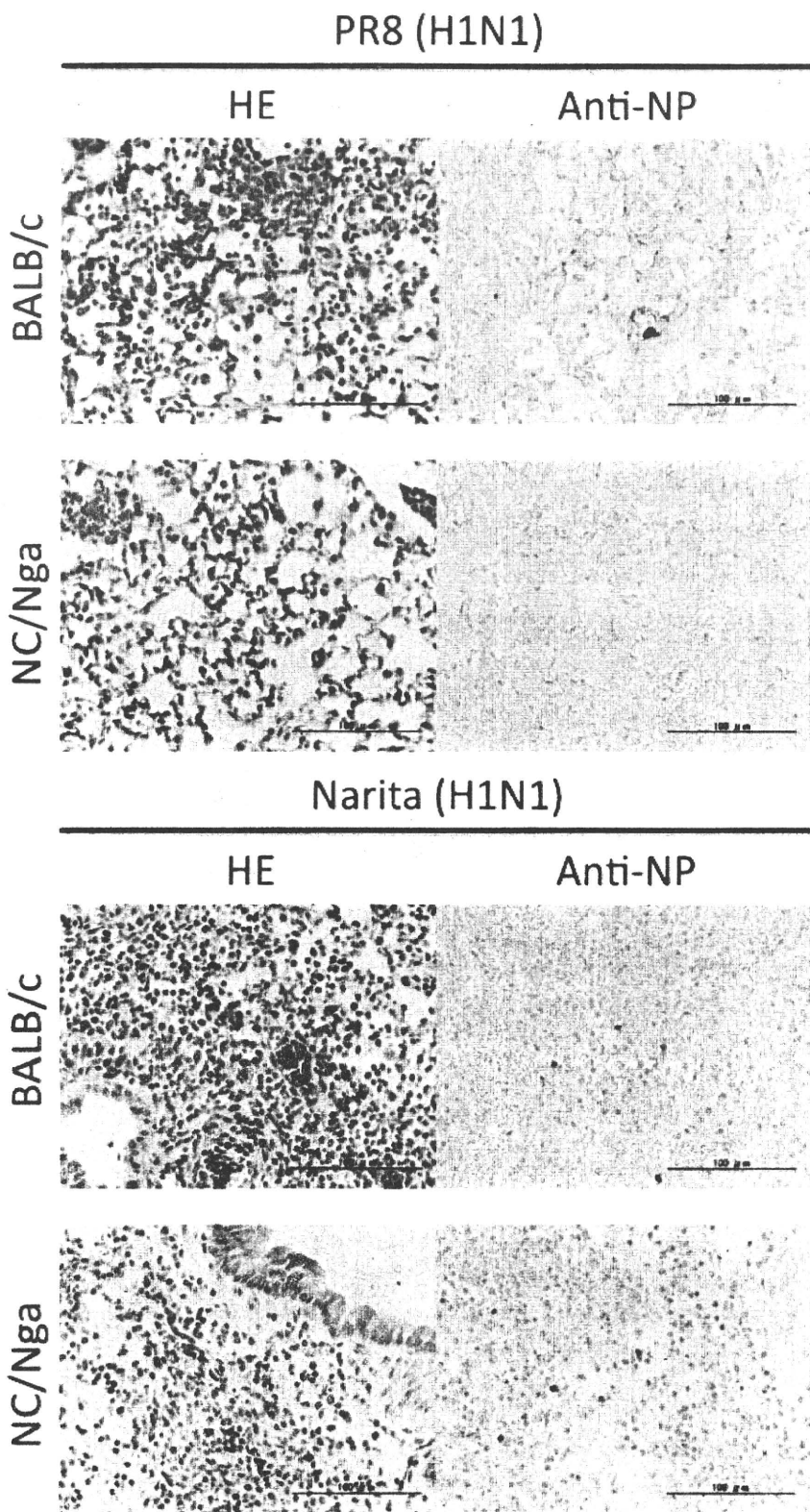


図2 インフルエンザウイルス100PFU/20 $\mu$ l経鼻接種7日目の病理学的検索

Control (PBS)

Asthma model (Alum + OVA)

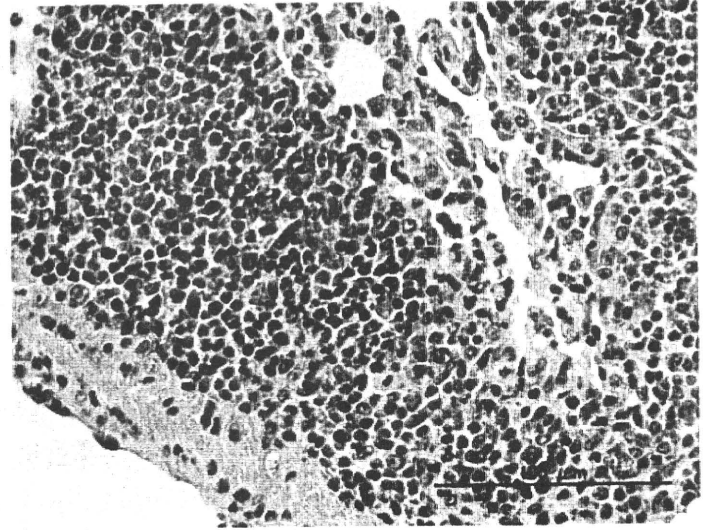
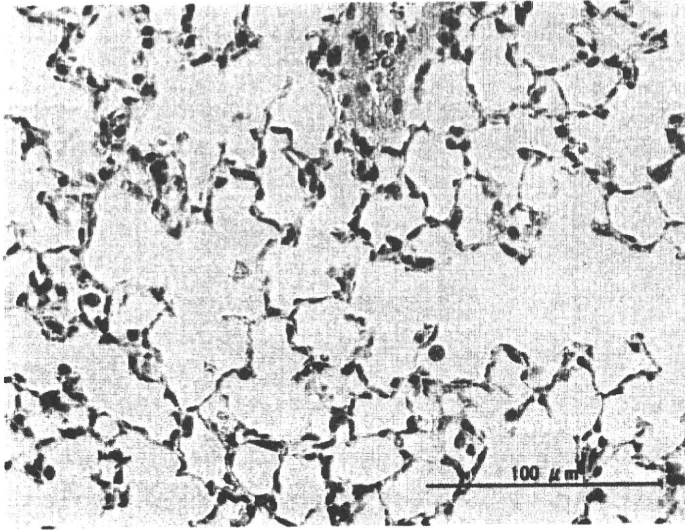


図3 OVA-Alum投与気管支喘息モデルの病理学的検索

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

|       |        |               |
|-------|--------|---------------|
| 分担研究者 | 高橋 宜聖  | (国立感染症研究所免疫部) |
| 研究協力者 | 小野寺 大志 | (国立感染症研究所免疫部) |
|       | 阿戸 学   | (国立感染症研究所免疫部) |
|       | 小林 和夫  | (国立感染症研究所免疫部) |
|       | 築地 信   | (星薬科大学)       |

**研究要旨**

2009年新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)が惹起する抗ヘマグルチニン(HA)抗体について、そのエピトープ構造に関する詳細な解析はこれまで行われていない。そのため、ウイルス中和に必要なアミノ酸配列や、季節性ウイルスとの交叉反応性について、明確な結論は得られてない。本研究では、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を作製するため、新型インフルエンザワクチン接種者から、HAを認識する記憶B細胞を単離・同定する新しい技術を開発した。さらに、HAを認識する記憶B細胞から抗体重鎖・軽鎖遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体を作製する実験システムを構築した。

**A. 研究目的**

新型インフルエンザウイルス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モノクローナル抗体を作製する。

**B. 研究方法**

(1) ヒト血清ならびに末梢血細胞の調製

新型インフルエンザワクチンを接種したボランティアからヘパリン含有末梢血を採取し、フィコール遠心分離により末梢血単核球を分離した。

(2) フローサイトメトリによるHA特異的記憶B細胞の同定と分離

ヒト末梢血単核球を抗IgG FITC抗体、抗CD19

Pacific Blue抗体、抗CD27 APC抗体、HA-PE、Propidium iodideで染色し、CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>細胞の中から、HA結合性を有する記憶B細胞を同定した。さらに、この細胞をFACS Ariaを用いて96ウェルプレートの各ウェルに、1 cell per wellにて分離した。

(3) 抗体重鎖・軽鎖遺伝子のクローニング

分離した細胞からcDNAを合成し、PCRにより抗体遺伝子V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>を増幅した。各遺伝子を抗体発現ベクターに組み込みクローニングを行った。

(4) 培養細胞を用いた抗体タンパクの発現

HEK293細胞株にクローニングした抗体V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>発現ベクターを形質転換し、5日間培養した後、上



清中に産生された抗体のHA結合性をELISAにより確認した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。ヒト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) 新型インフルエンザウイルス HA に結合する記憶 B 細胞の同定

ワクチン接種前・接種後の末梢血単核球を蛍光標識した HA や記憶 B 細胞のマーカー分子に対する抗体で染色した。フローサイトメトリにより HA 結合性の記憶 B 細胞数を測定した結果、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 (図 1)。

#### (2) 記憶 B 細胞が発現する抗体 $V_H/V_L$ 遺伝子のクローニング

Wardemann のグループにより開発され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 細胞が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  $V_H/V_L$  遺伝子をクローニングすることに成功した。

(3) 哺乳動物細胞を用いた抗体タンパクの発現  
クローニングに成功した  $V_H/V_L$  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 (図 2)。

### D. 考察

近年、単一のヒト B 細胞から、抗体  $V_H/V_L$  遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発され、季節性インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体の結合性解析や HIV に対するヒト中和抗体の単離など、様々な研究成果が報告されている。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。

この手法は、他のヒトモノクローナル抗体作製技術と比較し、少量 (5 ml 程度) の血液で実験が可能なこと、さらに、記憶 B 細胞のみならず、他の分化段階の B 細胞が発現する抗体タンパクの作製も可能なことなど、様々な利点がある。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行きたいと考えている。

### E. 結論

新型インフルエンザウイルス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モノクローナル抗体を作製することに成功した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) 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

- (2) 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
- (3) 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

## 2. 学会発表

(千葉大G-COEシンポジウム、東京、2010年12月)

- (1) 高橋宜聖 「Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs」

[国際学会発表]

(第14回国際免疫学会、神戸、2010年8月)

- (2) 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」
- (3) 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.」

## H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

図1 フローサイトメトリによる末梢血 HA 結合性記憶 B 細胞の同定

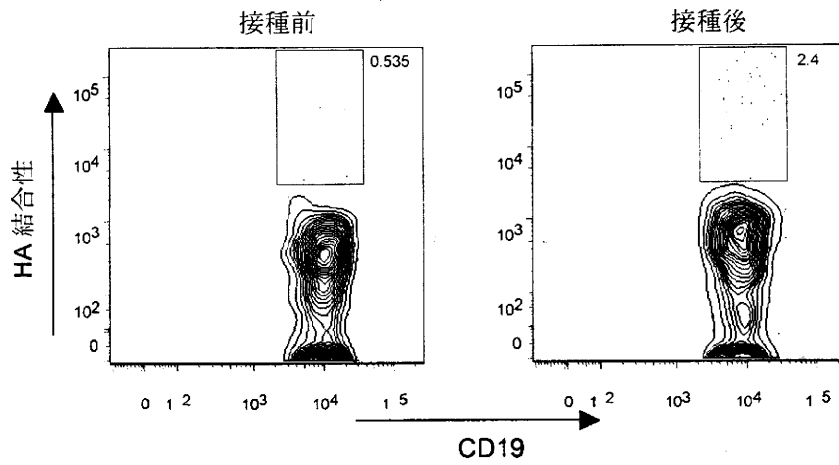
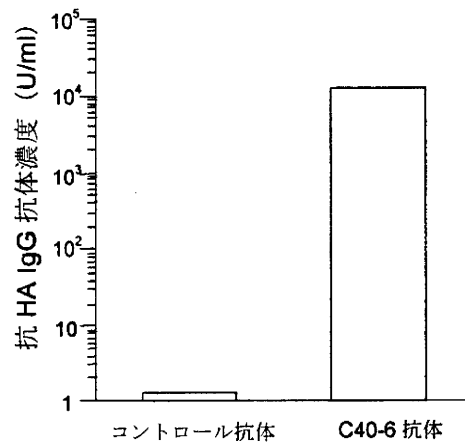


図2 細胞株に発現させたモノクローナル抗体の HA 結合性



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）  
分担研究報告書

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

研究分担者 高下 恵美 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 主任研究官

**研究要旨** 新型インフルエンザH1N1ウイルスは季節性H1N1ウイルスとは抗原性が異なるため、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さないと考えられている。しかし、新型H1N1ウイルスに対するワクチンの臨床試験において交叉反応性を示す可能性が示唆された。そこで、本研究では抗NA抗体に注目し、新型H1N1ウイルスに対する抗NA抗体と季節性H1N1ウイルスに対する抗NA抗体の交叉反応性について解析を行うために、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。

**A. 研究目的**

新型インフルエンザH1N1ウイルスは季節性H1N1ウイルスとは抗原性が異なるため、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さないと考えられている。しかし、新型H1N1ウイルスに対するワクチンの臨床試験において、1回接種で効果的な免疫応答が期待できることが報告され、季節性H1N1ウイルスに対するワクチン接種が、新型H1N1ウイルスに対するワクチン接種に対してプライミング効果を示す可能性が指摘された。この現象は交叉反応性を示さない抗体の存在によっては説明できない。インフルエンザウイルスに対する免疫応答は主に、ウイルス粒子表面に存在する主要抗原であるHA蛋白に対する抗体誘導によると考えられている。しかし、ウイルス粒子表面にはHA蛋白とNA蛋白の2種類の蛋白が存在しており、NA蛋白に対する抗体も誘導される。また、わが国のワクチンは

スプリットワクチンであり、HA蛋白の他にNA蛋白も含まれるため、ワクチン接種によってもHA蛋白のみならずNA蛋白に対する抗体も誘導されると考えられる。インフルエンザに対する免疫応答に関する研究は、その多くが対象をHA蛋白としている。そこで本研究では、特にNA蛋白に注目し、新型H1N1ウイルスに対する抗NA抗体と季節性H1N1ウイルスに対する抗NA抗体の交叉反応性について検討し、免疫応答における抗NA抗体の役割について明らかにすることを目的とする。

**B. 研究方法**

ワクチン接種あるいは自然感染により誘導された抗NA抗体とインフルエンザウイルスとの反応性をNA活性阻害効果を指標にして解析するために、新たな実験系の構築を行った。新型H1N1ウイルス(A/California/7/2009)感染抗

血清、季節性H1N1ウイルス

(A/Brisbane/59/2007)感染抗血清および季節性H1N1(A/WSN/33)高度免疫抗血清を階段希釈し、それぞれウイルスと混合して抗原抗体反応を行った。NA活性の測定にはMUNANA基質を用いる蛍光法およびNA-Star基質を用いる化学発光法の2種類の方法が広く利用されている。そこで、本研究では蛍光法および化学発光法の両方の系を用いて、抗原抗体反応後の各ウイルスのNA活性を測定、比較し、NA活性阻害効果を判定した。

### C. 研究結果

NA-Star基質を用いた化学発光法により、新型H1N1ウイルスおよび季節性H1N1ウイルスに対する抗血清は濃度依存的にそれぞれのウイルスのNA活性を阻害することが確認された。一方、MUNANA基質を用いた蛍光法では濃度依存的な阻害を検出できることができなかった。一般的にNA活性阻害実験では、NA阻害薬が用いられる。本研究では薬剤ではなく、抗血清に含まれる抗体によるNA阻害活性阻害効果を検出することを目的としている。今回の化学発光法および蛍光法における結果の差異は、NA-Star基質とMUNANA基質の分子量の違いによる可能性が示唆される。NA-Star基質を用いる化学発光法はMUNANA基質を用いる蛍光法よりも10-100倍程度少ないウイルス量で測定可能な感度の高い方法であり、今後はNA-Star基質を用いる化学発光法により、ウイルスと抗血清との反応性について解析を行うこととした。

### D. 考察

NA-Star基質を用いる化学発光法によるNA活性測定によって、ウイルスと抗血清との反応性をNA活性阻害効果を指標として解析できる可能性が示された。

### E. 結論

今回構築した実験系を用いて、今後はワクチン接種前後あるいは自然感染後のヒト血清を用いて解析を行う計画である。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

## 2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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、田代真人、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。

浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美名、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。

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、田代真人、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。

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、田代真人、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。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## ヒト抗体による新型ウイルス抗原認識領域の解析

研究分担者 中内美名 国立感染研究所・インフルエンザウイルス研症究センター第二室 研究員

**研究要旨** 2009年4月以降、ブタ由来の A/H1N1 インフルエンザウイルス(新型ウイルス)が世界規模の大流行を引き起こした。新型ウイルスは、季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス(季節性ウイルス)とは抗原性が異なるため、季節性ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さず、ウイルス抗原 HA の抗原領域情報は未だ報告されていない。本研究では、ヒト中和抗体が認識する HA 上の重要なアミノ酸の特定を行うことにより、抗原性の変異への迅速な対応を可能にすることを目的とする。本年度は 84 人のワクチン接種前後のペア血清を用いて、新型ウイルス特異的抗原領域の同定を試みた。

### A. 研究目的

2009年4月以降、ブタ由来の A/H1N1 インフルエンザウイルス(新型ウイルス)が世界規模の大流行を引き起こした。新型ウイルスは、季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス(季節性ウイルス)とは抗原性が異なるため、季節性ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さず、ウイルス抗原 HA の抗原領域情報は未だ報告されていない。今後、新型ウイルスの持続的流行によりウイルスの病原性、抗原性が変化し、犠牲者が増加することが懸念される。本研究では、ヒト中和抗体が認識する HA 上の特定のアミノ酸残基と抗原性変異との関連を明らかにし、今後生じる抗原変異への迅速な対応を可能にすることを目的とする。本年度は、ワクチン接種前後のヒトペア血清を用いて、

ヒト血清抗体が結合する新型ウイルス HA 上の特異的抗原領域の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. ヒト血清

新型ウイルスワクチン(1 価のワクチン)接種前、接種後で新型ウイルスに対する HI 価が上昇した 84 人のペア血清を用いた。

#### 2. インフルエンザウイルス HA 遺伝子のクローニング

A/Narita/1/2009 株、A/WSN/33 株の HA 遺伝子の cDNA を RT-PCR により合成後、発現ベクター pME18S にクローニングした。

#### 3. キメラ HA の構築

① Narita/WSN(HA1:Narita、HA2:WSN)、  
② WSN/Narita(HA1:WSN、HA2:Narita)、  
③ Narita Ag/WSN(抗原領域のみ Narita HA に組



み換えた WNS HA)、④Narita Sa/WSN(主に Sa 領域を Narita HA に組み換えた WNS HA)、⑤Narita Sb/WSN(主に Sb 領域を Narita HA に組み換えた WNS HA)をそれぞれ PCR により作製し、pME 18S vector にクローニングした。

#### 4. HA 蛋白質の単独発現

発現ベクターにクローニングした各キメラ HA cDNA を COS 1 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にエタノール・アセトン(1:1)により固定した。

#### 5. ヒト血清を用いた蛍光免疫染色

各ヒト血清の Narita HA、WSN HA および各キメラ HA に対する結合能を間接蛍光免疫染色法により測定した。ヒト血清(100 分の 1 希釈)は各キメラ HA 発現固定化細胞と 37°C、1 時間反応後、FITC 標識抗ヒト抗体とさらに反応し、顕微鏡下で観察した。

### C. 研究結果

キメラ HA Narita/WSN および WSN/Narita と 84 人のヒトペア血清との反応性を検討した。その結果(i)ワクチン接種前後共に Narita /WSN、WSN /Narita に反応するグループ(グループ 1)、(ii)ワクチン接種前の血清は反応しないが、ワクチン接種後の血清が Narita /WSN、WSN /Narita 両 HA に反応するグループ(グループ 2)、(iii)ワクチン接種後の血清のみが Narita/WSN にのみ反応するグループ(グループ 3)、の 3 つのグループに概ね分けられた。

グループ 3 は新型コロナウイルス特異的抗原領域を認識すると考えられるため、さらに検討したところ、Narita Ag/WSN、Narita Sa/WSN に反応するグループ A、Narita Ag/WSN、Narita Sb/WSN に反応するグルー

プ B、それ以外のグループ C に分けられた。

### D, E. 考案と結論

84 人のヒトペア血清と各キメラ HA に対する反応性の比較により、ワクチン接種に関わらず WSN 株と Narita 株 HA を共に認識する抗体を持つグループ(グループ 1)、ワクチン接種後に WSN 株および Narita 株 HA を認識する抗体が上昇したグループ(グループ 2)、ワクチン接種後に新型コロナウイルス特異的抗原領域を認識する抗体が上昇したグループ(グループ 3)に概ね分けられることが明らかとなった。新型コロナウイルス 1 価のワクチン接種後に WSN 株と Narita 株 HA の共通領域を認識する抗体が上昇した事が示唆され(グループ 2)、今後季節性ウイルスとの交差反応性に関しても検討していく予定である。また、グループ 3 をさらに検討した結果により、ワクチン接種後に Sa 領域を特異的に認識すると考えられる抗体が上昇するグループ A と、Sb 領域を特異的に認識すると考えられる抗体が上昇するグループ B があることが明らかとなった。今後これらに関しては、認識する領域の絞り込みと重要なアミノ酸を特定する予定である。

グループ 3 の血清を用いることにより、新型コロナウイルス特異的抗原領域の同定が可能となった。今後、各人のワクチン接種歴や、インフルエンザ感染歴、年齢などが、新型コロナウイルス接種により惹起される抗体のタイプにどのような影響を与えたかを検討する。さらに、感染前後のペア血清を用いて同様の解析を行い、ワクチン接種による抗体応答との比較を行う。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

### 2. 学会発表

#### ・国際会議

Mina Nakauchi, Tsutomu Kageyama, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Emi Takashita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kunihiro Oba, Nami Konomi, and 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, Hong Kong, 2010, September

#### ・国内会議

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、田代真人、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

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析

分担研究者 西村秀一 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルスセンター

**研究要旨** 本研究において血清疫学を中心に分担に加わったわれわれは、本年度は、医療機関での職員および特殊な入院患者に対する新型インフルエンザワクチン接種が、どの程度の抗体価上昇をもたらしたかを調べる研究と、今回の新型流行の際に気がついた、小児患者での短期間における再感染の可能性の血清学的検討という大きく 2 つの研究に着手し、当初の目的どおりに、一定の成果を手にすることができた。

**A. 研究目的**

ひとつは、新型インフルエンザワクチン接種が、血清学的にどれだけ効果があったかを分担者の持つフィールドで調査することである。

もうひとつは新型インフルエンザという分担者にとって研究者としてまったく新しい出来事に際し多数経験した、季節性のインフルエンザでは経験することのなかった小児患者での短期間での再感染を疑わせる症例について、その可能性を血清学的に検討することである。2009 年の新型インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm によるパンデミックで、東京都の某小児科医院において、患者の増加に伴い一度インフルエンザ迅速診断キットで A 型と診断された患者が、その後 1-4 か月ほどで再び受診し、その際にもキット検査で再度 A 型陽性となる例が 5 か月間で 32 例を数えた。これらの症例が短期間における新型インフルエンザの再感染であった可能性について、ウイルス学的に調べてみた。

**B. 研究方法**

**I 3 つの医療施設の医療従事者における新**

**型インフルエンザワクチン接種による抗体価の推移の検討**

われわれは、以下の 3 つの医療施設での新型インフルエンザワクチンの接種の効果につ

いてしらべ、その過程で遭遇したさまざまな課題を解決しつつ、研究を遂行した。

1) 国立病院機構仙台医療センター (以下 S 病院) 職員 100 例

2) 自衛隊仙台病院職員 (以下 J 病院) 116 例

3) 国立病院機構八戸病院 (以下 H 病院) 入院患者 72 例

1) 2) については、インフォームドコンセントのもと、新型ワクチン接種による抗体価の上昇を確認したいと願う職員から採血した血清を用いた。

3) については先天的あるいは後天的重症心身障害で、感染管理上の必要性をもとにした主治医の要請を受け、抗体価測定を行った成績である。

解析のために得られた上記の血清について、赤血球凝集阻止試験で、A(H1N1)pdm ウイルスに対する抗体価を試みた。HI 試験に先立ち、定法により最初に、酵素ノイラミニダーゼを用いた R

DE処理（デンカ生研社製）のRDE-IIによる血清中の非特異的赤血球凝集阻止物質（インヒビター）の除去を行った後、非特異的赤血球凝集素の吸収除去を目的にモルモット血球と反応させ、その遠心上清を1:10希釈血清としてHI試験に供した。

HI試験は、デンカ生研社より購入し8HAに調整した血清抗体測定用HA試薬のA/California/07/2009(H1N1pdm)液を抗原として、最終的にモルモット血球の凝集性を指標に定法に従って行った。以下にその成績を順次述べる。

## II 小児における新型インフルエンザウイルスの再感染の検討

2009年12月24日以降に受診し、キットで二度目のA型陽性を示した症例について、再度鼻咽頭拭い液を採取し、ウイルス分離を試みた。また、二度目罹患を疑う症例では、受診時の急性期血清は初回感染の回復期血清に相当すると考え、その血清抗体価を測定した。保護者の同意のもとに採血を行い、二度目のキット陽性かつA(H1)pdmウ

イルス分離陽性の患者9例（1-15歳）の血清を得て、それらについてHI試験で抗体価を測定した。また、マイクロ中和法による抗体価測定も行った。更にS<sup>35</sup>MetでラベルしたA(H1)pdmウイルス感染細胞を抗原とした、より検出感度が高い、放射免疫沈降(RIP)法による抗体の証明も試みた。

## C. 研究結果

### I-1. S病院職員の新型インフルエンザワクチン1回接種後の抗体反応

表1は、S病院職員100名のワクチン接種前後の抗体価測定の成績を、以下の4つの指標でまとめたものである。GMT（Geometric Mean Titer）幾何平均抗体価；SPR（Sero-positive Ratio）抗体保有率；HI価1:40以上の人の割合；SCR（Sero-conversion Ratio）抗体陽転率：ワクチン接種前のHI価が1:10以下で、接種後1:40以上になった人あるいは接種前HI価1:10以上で接種後4倍以上上昇した人の割合；SCF（Sero-conversion Factor）抗体増加率：接種前後でのGMTの増加率

表1. S病院職員ワクチン1回接種前後の抗体価の推

n=100

|         | GMT                  | SPR(%)           | SCR(%)           | SCF(%)              |
|---------|----------------------|------------------|------------------|---------------------|
| 接種前     | 580/100<br>(5.8)     | 4/100<br>(4.0)   |                  |                     |
| 接種後 1ヶ月 | 16970/100<br>(169.7) | 82/100<br>(82.0) | 78/100<br>(78.0) | 169.7/5.8<br>(29.3) |
| 接種後 8ヶ月 | 9690/100<br>(96.9)   | 63/100<br>(63.0) | 57/100<br>(57.0) | 96.9/5.8<br>(16.7)  |

その結果、ワクチン接種前に抗体価1:40以上を示したのは4名であった。これら4例はすべて