

Ⅰ 総括研究報告

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 総括研究報告書

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

主任研究者：山中 昇（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授）

研究概要

（目的）

急性呼吸器感染症（ARI）はインフルエンザやRSなどのウイルスおよび、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米医学協力研究ARI部会の活動ともリンクし、日米および東南アジアにおけるARI関連疾患の予防・制御を目的とする。本研究のキーワードは、疫学的データの集積・特徴的な臨床像の解析、病態の解明、ウイルスと細菌の重複感染による重症化、変異と薬剤耐性、ワクチンによる予防と新しい予防手段の開発である。

（方法）

Pandemic A(H1N1)2009（以下A(H1N1)pdm09）インフルエンザについては、本研究組織の特徴であるウイルス学および細菌学のARI分野の基礎・臨床の研究者が協力して、～について検討をすすめた。東南アジアをはじめ全世界で蔓延し、ヒトにおける発生からパンデミックへの危険性が高まっているA(H5N1)高原性鳥インフルエンザのモニタリングも非常に重要と考え、新たな「新型インフルエンザ」の可能性や薬剤耐性ウイルスの出現について検討した。細菌感染症においては薬剤耐性菌の世界的な急増が大きな問題となっており、本邦においても呼吸器感染症の主要起炎菌耐性化が急速に進んでいる。本研究では2011年に大流行したマイコプラズマ肺炎から分離したマイコプラズマのsubtypeや薬剤耐性の検討、肺炎球菌やおよびインフルエンザ桿菌の薬剤感受性の推移、バイオフィルム形成による難治化の病態、7価肺炎球菌ワクチン接種に伴う血清型の分布およびその変化、蛋白抗原による新しい分類およびワクチン候補などの検討を行った。

(結果と考察)

1. インフルエンザウイルス感染の重症化の病態

A(H1N1)pdm09)インフルエンザにおいて小児を中心に重症のウイルス性肺炎が多発した。重症化の病態を解析するために、マウスの肺および脳で増殖する A/WSN33(H1N1)を用いてインフルエンザウイルスに対する局所免疫応答を検討したところ、肺炎群・脳炎群ともに G-CSF, IFN , IL-12, MCP-1, IP-10, TNF など、ほぼ同様の炎症性サイトカインが上昇していた。肺炎群では気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IP-10 が、脳炎群では脳脊髄液 (CSF) 中に抗炎症性サイトカインである IL-10, IL-13 が有意に上昇していた。感染局所は病態を反映しやすいため、局所の免疫反応を評価することが重症インフルエンザの病態解析に重要であると考えられた。

2. インフルエンザウイルスの伝播形式

ハムスターにおいて、ヒトインフルエンザウイルスがどのように個体間伝播するかを明らかにするため、A/California/04/09(H1N1)を用いて、直接接触伝播試験および飛沫伝播試験を行い、伝播性を解析した。その結果、直接接触伝播試験では、実験に用いた全てのハムスターで伝播することが確認できた。さらに飛沫伝播試験では、4匹中2匹で伝播が起こったことが確認できた。これらの結果から、A/California/04/09(H1N1)は、ハムスターにおいて飛沫を介した個体間伝播を起こすことが明らかとなり、ハムスターのインフルエンザウイルス飛沫感染モデルの可能性が示唆された。

3. インフルエンザワクチン

パンデミックの発生に備えて、短期間に大量のワクチンを供給する必要があるため、従来の孵化鶏卵培養法に代わり、MDCK 細胞などを用いた細胞培養法による新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。しかし、パンデミックワクチンを短期間大量に必要とする際には、よりウイルス生産効率の優れた細胞を開発する必要がある。本研究では、細胞培養ワクチンの実用化に向けて従来の MDCK 細胞よりもウイルス増殖能力が高い新規 MDCK 細胞の開発を試みた。I 型インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子である IRF7 に対する shRNA を安定発現させた新規 MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させると、コントロール MDCK 細胞と比較して HA 価が 2~8 倍上昇した。また、新規 MDCK 細胞において A/PR8 株のウイルス増殖性改善による I 型 IFN 産生量への影響を調べた結果、I 型 IFN 産生制御機構と別の経路を介してウイルス産生量が有意に増加した。以上より、ウイルス高増殖性を示す新規 MDCK 細胞の樹立によって効率的なワクチンシードウイルスの分離増殖が可能となり、大量のワクチン供給体制の構築に繋がることが期待される。

4．鳥インフルエンザ

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、ヒトのパンデミックウイルスの予測に資する情報を提供する。北部ベトナムの家禽から分離された H5N1 ウイルスは、北部では近年アジアで分離されているウイルスと同じクレード 2.3.2.1 に、南部ではベトナムで流行しているウイルスと同じクレード 1.1 に分類された。さらに分離された H6 および H9 ウイルスの HA 遺伝子は中国の家禽から分離されたウイルスのそれと近縁で、ベトナムの家禽の中で遺伝子再集合が頻繁に起きていることが判った。したがって国際連携によって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ことが極めて重要である。

5．マイコプラズマ感染

2011 年後半から大流行しているマイコプラズマ肺炎の原因である *M. pneumoniae* の subtypes, 薬剤耐性、7 価肺炎球菌ワクチン(PCV7)の普及に伴う IPD における肺炎球菌血清型の変化、新しい肺炎球菌蛋白抗原による肺炎球菌の分類やワクチン候補としての研究が行われた。2011 年から流行しているマイコプラズマ肺炎では、患者から *M. pneumoniae* subtype 1 の菌が多く分離され、その他には subtype 2 の亜型 variant 2a と 2c が見つかった。分離株のうち、マクロライド耐性株が 65.7%だった。

6．肺炎球菌ワクチン(PCV7)

小児市中肺炎に対する PCV7 導入効果の千葉市における検討では、5 歳未満小児市中肺炎入院数と、肺炎球菌性肺炎入院数の減少傾向があり、特に PCV7 含有血清型は著明な減少を認め、PCV7 導入による早期の効果が認められている。

7．肺炎球菌菌株共通抗原 PspA と新規ワクチン

新規ワクチン候補を検討するため、肺炎球菌蛋白抗原 PspA の検討が行われた。急性中耳炎、急性鼻副鼻腔炎あるいは急性咽頭・扁桃炎の患者における PspA の検討では、中耳貯留液、鼻汁、副鼻腔分泌液、咽頭分泌物から分離される肺炎球菌のほとんどは、PspA1 あるは PspA2 のいずれかに分類された。すなわち、PspA1 が 44.6%に、PspA2 が 49.4%に検出され、PspA 型の分離頻度は、莢膜血清型とは関連を示さなかった。さらに、いくつかの融合型 PspA を作成し、それに対する抗体の反応性を検討すると、ある特定の融合型 PspA 免疫によって得られたマウス特異抗体が全てのクレードの PspA に対して結合交差性を示し、また各種クレード発現肺炎球菌菌体に対する結合性、それらの致死感染モデルに対して感染防御効果を示した。以上のことから PspA を含めた肺炎球菌ワクチンは、血清型に関係なく肺炎球菌を広くカバーすることが可能であり、次世代の肺炎球菌ワクチン抗原として有用であると考えられた。

A . 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) はインフルエンザやRSなどのウイルスおよび、肺炎球菌やインフルエンザ菌などの細菌、マイコプラズマ、クラミジアなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米医学協力研究ARI部会の活動ともリンクし、日米および東南アジアにおけるARI関連疾患の予防・制御を目的とし、行政への提言も視野に入れている。本研究のキーワードは、疫学的データの集積・特徴的な臨床像の解析、病態の解明、伝播形式の解明、変異と薬剤耐性、ワクチンによる予防と新しい予防手段の開発である。

Pandemic A(H1N1)2009 (以下A(H1N1)pdm09)インフルエンザについては、本研究組織の特徴であるウイルス学および細菌学のARI分野の基礎・臨床の研究者が協力して、～ について検討をすすめた。一方、A(H1N1)以外の新たな「新型インフルエンザ」の登場や、東南アジアをはじめ全世界で蔓延し、ヒトにおける発生からパンデミックへの危険性が高まっているA(H5N1)高原性鳥インフルエンザのモニタリングを行い、遺伝子、抗原性および動物に対する病原性を解明し、国際連携によるウイルス流行の対策を検討した。

インフルエンザ以外の呼吸器感染ウイルスの流行・伝播を検討するため、フィリピンでのエンテロウイルスやライノウイルスの季節性および地域による流行

様式の解析を行った。

細菌感染症においては2010年に本邦で認可され、2012年から本格的に普及しているPCV7の呼吸器感染症とその起炎菌、薬剤耐性菌の変化を検討し、さらにpost-PCV7の影響としての血清型の変化、その対策としての菌株共通蛋白抗原PspAの新規ワクチン候補としての検討をおこなった。さらに2011年から流行しているマイコプラズマ肺炎の起炎菌である*M.pneumoniae*の分子疫学的解析や呼吸器疾患の難治化の重要な原因であるバイオフィーム形成と肺炎球菌莢膜やインフルエンザ菌との関連についても研究を進めた。

B 研究方法

インフルエンザウイルス感染およびその他の呼吸器ウイルス感染

1. インフルエンザ関連脳炎/脳症や肺炎における局所の免疫応答を解明するため、インフルエンザによる肺炎と脳炎における全身および局所でのサイトカイン・ケモカインプロファイルを比較検討した。
2. 2009年にパンデミックを起こしたインフルエンザウイルス (A/California/04/09(H1N1)[Ca104]) を用いて、まず、ハムスターにおけるウイルスの増殖性について解析し、感染ハムスター：非感染ハムスターを同居飼育する直接接触伝播試験と、感染ハムスター：非感染ハムスターをメッシュ板で仕切って飼育する飛沫伝播

- 試験を行った。両試験とも、感染群へのウイルス接種から1日後に非感染群を同居させた。感染後、体重変化を観察するとともに、鼻腔洗浄液中のウイルス量と、中和抗体価を測定した。
3. コントロール MDCK 細胞と新規 MDCK 細胞に A/PR8 株(A/H1N1)、A/Narita/1/2009 株(A/H1N1pdm09)、B/Florida/4/2006 株(B/山形系統)、A/Victoria/361/2010 株(A/H3N2)感染後、培養上清中のウイルス液の HA 価を測定した。さらに、A/PR8 株感染後、培養上清中のウイルス RNA 及び細胞内 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にてウイルス産生量及び IFN- γ 産生量を定量し、比較検討した。
 4. 2010/11, 2011/12, 2012/13 のインフルエンザ流行期 3 シーズンに、発熱や呼吸器症状を主訴としてインフルエンザ感染症を疑われ、迅速検査を実施した小児において鼻汁を採取し、インフルエンザウイルスの分離と同定を行い、TCID 法でウイルス量(TCID₅₀/mL)を測定した。さらに、検体の培養細胞への感染により 1 度増殖させたウイルス液を用い、各種ノイラミニダーゼ阻害薬に対する IC₅₀ を解析した。NA 配列は検体から抽出した RNA を RT-PCR で増幅し決定した。
 5. 2008-2009 年、2009-2010 年、2010-2011 年、2011-12 年の 4 シーズンにおいてペイルート市のアメリカンペイルート大学外来を受診したインフルエンザ様疾患を呈する外来患者から鼻咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルス A, B 迅速診断キットによるスクリーニングを行った。その後、迅速診断キット陽性検体を新潟大学に輸送し、MDCK 細胞にてウイルス分離を行い、培養検体から RNA を抽出し、cDNA 合成を行いリアルタイム PCR で型・亜型判定を行った。流行ウイルス株の特徴は、ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)遺伝子配列をシーケンシングし、ウイルス系樹解析により分析した。また、分離培養された各型・亜型ウイルス株選択した株で、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルに対して NA 阻害剤感受性検査を行った。
 6. 日本、モンゴルおよびベトナムにおいて家禽から採取した気管ぬぐい液および野鳥の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、推定される HA 開裂部位のアミノ酸配列を解析した。ベトナムで分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスおよび H6、H9 亜型のウイルスは、遺伝子と抗原性を過去に分離されたウイルスのそれらと比較した。
 7. 健常人ボランティアに対して、

A/Victoria/210/09(H3N2) ウイルス全粒子不活化ワクチン(阪大微生物病研究会より提供) を片鼻 250 μ l ずつ (計 500 μ l) 3 週間間隔で 2 回の経鼻接種を実施した。ワクチン接種開始より 3 週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った。中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。血清あるいは鼻腔洗浄液の段階希釈系列を調製し、100 TCID₅₀ (50%組織培養感染量の 100 倍量) のウイルス液と混合後、30 分間インキュベーションした。その後、この混合液を MDCK 細胞に添加し 4 日間培養を行い、顕微鏡下でインフルエンザウイルスによる細胞変性効果が確認できないサンプル最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

8. インフルエンザウイルスの遺伝子複製酵素の 3 つのサブユニット(PA、PB1、PB2) のうち一部を入れ替えると自身の遺伝子複製酵素の活性が著しく障害されることを明らかにしており、今回、WSN 由来の RNP を細胞内に構築し、そこに競争的に阻害効果のある PB2 を作用させ阻害効果をルシフェラーゼによるレポーターアッセイにより確認した。
9. フィリピン・レイテ島に位置する東ビサヤ地域医療センターに重症肺炎で入院した小児・成人患者、またレイテ島内に位置する三箇所の外来医院を Influenza-like illness (ILI) 症状

で受診した小児・成人患者を研究対象とし、計 5240 名から鼻咽頭ぬぐい液を採取した。採取した検体から遺伝子を抽出し、PCR 法によりエンテロウイルス EV68 遺伝子の検出を行なった。東ビサヤ地域医療センターにて重症呼吸器感染症と診断され入院した小児 (生後 7 日 ~ 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 でスクリーニングを行った後、同領域及び VP4 領域のシーケンス解析を行いライノウイルスの種及び系統 (血清型) を決定した。

肺炎マイコプラズマ、呼吸器細菌 (肺炎球菌、インフルエンザ菌) 感染

1. マイコプラズマ肺炎

臨床分離株の遺伝子型別を行い、近年増加している variant 2a 菌のゲノムを解析した。2011 年流行時におけるマイコプラズマ肺炎による入院患者の臨床像について臨床疫学研究検討を行った。14 都道府県 47 医療機関 (小児科 38 施設、内科・呼吸器科 9 施設) からマイコプラズマ肺炎患者 (176 例) の臨床情報を収集し、その治療効果を抗菌薬ごとに比較した。また、2007 年から 2012 年の間の 70 菌株 (倉敷中央病院) について、遺伝子型別、薬剤耐性を解析した。

2. 肺炎球菌表面蛋白 PspA の融合蛋白の交叉反応についての研究

PspA のファミリー 1 とファミリー 2 の抗原エピトープが存在する部分の遺伝子領域を制限酵素 *EcoRI* サイトで融合させ、pET28a(+)ベクターに挿入して、融合 PspA タンパク質発現ベクターを作成した。作成した各融合 PspA タンパク質発現ベクターを *E. coli* BL21(DE3) にそれぞれ形質転換し、融合 PspA タンパク質を大量発現させた。目的の融合タンパク質であることを確認後、各融合タンパク質とアジュバント (Alum+CpGK3) を C57/BL6j マウスに皮下接種し、血清中の抗 PspA 抗体価を測定した。融合 PspA タンパク質免疫血清中 IgG の各 PspA クレイド肺炎球菌表面への結合能は 5 種類 PspA クレイドを用いて、菌体に結合する蛍光強度をフローサイトメトリー法で測定した。さらに融合 PspA タンパク質免疫によるマウス致死性肺炎モデルの感染防御効果については、マウスに融合 PspA タンパク質の免疫を行い、PspA のクレイド 1～5 を発現する肺炎球菌株 5 株を経鼻接種し、マウス致死性肺炎モデルを作成した。免疫マウスへの肺炎球菌感染後、2 週間にわたってその生存率を観察した。

3. 上気道感染症由来肺炎球菌の PspA 型、薬剤感受性、血清型の検討

2003 年 1 月から 5 月に耳鼻咽喉科領域感染症サーベイランスにより得られた肺炎球菌株 251 株を用いた。

ペニシリン G に対する感受性は米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 標準法に基づき検討し、ペニシリン G に対する MIC が、2 µg/ml をペニシリン耐性菌 (PRSP)、0.1~1 µg/ml をペニシリン中等度耐性菌 (PISP)、0.06 µg/ml をペニシリン感性菌 (PSSP) とした。PspA 型 (PspA family) の検討はプライマーとして、LSM12、SKH63、SKH52、SKH41、SKH42、SKH02、ply1、ply2 を用い、PCR 法により分類した (PspA 1 : LSM12/SKH63、PspA2 : LSM12/SKH52、PspA3 : SKH41/SKH42、*pspA* 遺伝子 : LSM12/SKH02、pneumolysin 遺伝子 : ply1/ply2)。

4. 小児肺炎、上気道感染症 (中耳炎、鼻副鼻腔炎) からの肺炎球菌の血清型
Statens 社製抗血清を用いた莢膜膨化反応によりおこなった。

5. バイオフィーム形成の検討

血清型別および PCR で判定された 26 株の β-lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS), 22 株の β-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR), 28 株の TEM-1 type β-lactamase-producing ampicillin-resistant (BLPAR) - Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) と 23 株の *H. influenzae* type b (Hib) に対して Microtiter biofilm assay (MBA) によるバイオフィーム形成の比較検討を行った。

TIGR4 *S. pneumoniae* の莢膜欠損株を作成し、野生株との間で MBA, Confocal laser scanning microscopy (CLSM) によるバイオフィーム産生の比較検討を行った。

C 結果

インフルエンザウイルス感染症およびその他の呼吸器ウイルス感染症

1. ウイルス感染後の局所サイトカイン・ケモカインの動態

ウイルス感染に対する局所反応をみるために、肺炎群では BALF 中、脳炎群では CSF 中のサイトカイン・ケモカインを測定した。G-CSF、IFN、IL-6、RANTES、MCP-1、IL-12、KC、MIP-1、IP-10、TNF は両群で上昇が認められた。特に IP-10 は肺炎群において、他のサイトカイン・ケモカインと比較し、著明な上昇が認められた。また、IL-10、IL-13 は脳炎群でのみ上昇が認められた。局所で特徴があったサイトカイン・ケモカインは肺炎群では IP-10 であり、脳炎群では IL-10、IL-13 であった。IL-10 や IL-13 の抗炎症性サイトカインは肺炎群では上昇が認められず、脳炎群でのみ感染 3 日目、5 日目に対照群と比較し有意な上昇が認められた。IP-10 は特に肺炎群で上昇し、感染 3 日目、5 日目に対照群と比較し有意な上昇が認められた。

2. 新型インフルエンザの伝播様式の検

討

a) ハムスターにおけるウイルスの直接接触伝播

ハムスター 3 匹に Cal04 ウイルスを感染させ、ウイルス接種 1 日後に非感染ハムスター 3 匹を同一ケージに同居させ、体重変化と、鼻腔洗浄液中のウイルス量を測定した。その結果、接種ハムスターは、感染後 2 日目から体重が減少し、非感染ハムスターは 6 日目から体重が減少した。さらに、ウイルス接種から 4 日目（同居から 3 日目）または 8 日目（同居から 7 日目）に、3 匹全ての非感染ハムスターの鼻腔洗浄液からウイルスが検出された。このことから、Cal04 ウイルスが個体から個体へと接触伝播することが確認できた。b) ハムスターにおけるウイルスの飛沫伝播

ハムスターに Cal04 を感染させ、メッシュ板で 2 つに仕切ったケージの一方にて飼育した（1 匹/1 ケージ）。ウイルス接種 1 日後に、メッシュ板で仕切られたもう片方の区画に、非感染ハムスターを同居させ、飛沫伝播の有無を調べた（1 匹：1 匹/1 ケージ × 4 組）。その結果、非感染ハムスター 4 匹中 2 匹で、鼻腔洗浄液からウイルスが検出され、中和抗体価の上昇が認められた。このことから、Cal04 は、ハムスターにおいて飛沫を介したウイルス伝播を起こすことが確認された。

3. インフルエンザウイルス高増殖性を

示す新規 MDCK 細胞の開発

ヒト I 型 IFN 誘導性遺伝子群を標的とする siRNA スクリーニングの結果、IRF7 をノックダウンするとコントロールに比べて再現性良くウイルス産生量が 2~4 倍増加した。A549 細胞と同様、MDCK 細胞においても IRF7 をノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量は約 4 倍まで増加した。shRNA コントロール細胞と shRNA_IRF7 発現細胞に A/PR8 株 (A/H1N1)、A/Narita/1/2009 株 (A/H1N1pdm09)、B/Florida/4/2006 株 (B/山形系統)、A/Victoria/361/2010 株 (A/H3N2) 感染後、培養上清中のウイルス液の HA 価を測定した結果、コントロール細胞と比較して 2~8 倍増加した。また、A/PR8 株感染後、培養上清中のウイルス RNA 及び細胞内 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にてウイルス産生量及び IFN- γ 産生量を定量した結果、ウイルス産生は改善されたが、I 型 IFN 産生能への影響は認められなかった。

4. 小児インフルエンザサーベイランス

2010/11, 2011/12, 2012/13 のインフルエンザ流行期 3 シーズンの小児インフルエンザ患者から、ノイラミニダーゼ阻害薬治療前後で経時的に検体を採取し、ウイルス分離と薬剤感受性の検討を行った。11 ヶ月児から治療後の回復期に分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスは H275Y 変異

を有するオセルタミビル耐性ウイルスで、患者からのウイルス排泄は遷延した。本例以外には、現時点で耐性化の問題は発見されていないが、解析を継続中である。

5. 中東(レバノン)におけるインフルエンザサーベイランス

レバノンでは、季節性インフルエンザ流行は冬季であった。また、H1N1pdm09 の流行は 2009 年の 6 月及び 10 月から 11 月であった。また、各型、亜型の流行はヨーロッパと類似していた。また、系統樹解析によりレバノンで分離された株がその他の中東諸国とヨーロッパで分離された株、そしておそらくアジアの株と近縁であることが明らかになった。薬剤耐性ウイルスに関しては、2008-2009 年シーズンにおいて世界的に流行した季節性オセルタミビル耐性 H1N1 の限定的な流行と、地域レベルで 2009 年と 2010-2011 年シーズンにそれぞれ H275Y 変異と S247N 変異をもつ H1N1pdm09 が分離されたのみであった。

6. 鳥インフルエンザサーベイランス

野鳥の糞便 8,316 検体から 165 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 は H2 から H13 の 12 の亜型に、NA は N1 から N9 の 9 つの亜型に区分された。ベトナムで一見健康なアヒルおよびバリケンから分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、クレ

ード 1.1 と 2.3.2.1 に分類された。これら 2 つのクレードに属するウイルスの抗原性を 2004 年にベトナムで分離された H5N1 ウイルスのそれと HI 試験で比較したところ、抗原性に大きな差があることがわかった。この抗原変異には家禽に対するワクチン接種が関わっているものと考えられる。さらにベトナムの家禽から分離された H6 ウイルスの HA 遺伝子は全て、中国南部の家禽から分離された H6 ウイルスのそれと近縁で、Group 2 亜系統に分類された。これらのウイルスは野生水禽由来の H6 ウイルスとは抗原性が大きく異なっていた。また、H9 ウイルスの HA 遺伝子は、中国南部の家禽から分離された H9 ウイルスのそれと近縁で、Y280 亜系統に分類された。これらのウイルスは、同亜系統の参照株 A/chicken/Hong Kong/G9/1997 (H9N2) と類似する抗原性を示した。さらに、同じ時期に同じ地域で分離された同一亜型のウイルスでも、その内部遺伝子の由来は様々であった。この知見は生鳥市場や農場で遺伝子再集合が頻繁に起こっていることを示している。

7. 経鼻インフルエンザワクチンと交叉免疫応答

接種ワクチンとは異なる A/Sydney/05/97 に対する中和抗体価は、20 ~ 60 歳に該当する被験者に関

して、ワクチン接種後 (6 w) の血清のワクチン接種前 (0 w) の血清の中和抗体価の 1.46 倍であったが、鼻腔洗浄液の中和抗体価は 2.12 倍となった。ワクチン株である

A/Victoria/210/09 に対する中和抗体価の上昇は血清で 8 倍、鼻腔洗浄液で 5.88 倍と比較し低いもののワクチン株と比較し 10 年以上前に分離されたウイルス株にたいしても中和抗体の上昇が認められその上昇率は鼻腔洗浄液で高かった。

8. インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素サブユニットによる複製酵素阻害

サブユニット PB2 によって濃度依存的に WSN の遺伝子複製が阻害されることを確認した。PB2 断片を作成したところ、重要部位が PB2 の N 末端に存在することが判明し、さらに PB2 上の重要部位を特定した。この断片の阻害作用は著しく強く、H5N1 に対しても強い阻害作用を示した。またこの阻害作用はブランクアッセイでも確認され、ウイルスの増殖を抑制することが分かった。

9. エンテロウイルス、ライノウイルス感染

総計 5240 名から採取された呼吸器検体のうち、12 検体 (0.23%、12/5240) から EV68 遺伝子が検出された。EV68 の検出率は、小児肺炎患者で 0.76% (9/1187)、成人肺炎患者で 0.44%

(2/456) ILI 患者で 0.028%(1/3597) であり、肺炎患者における EV68 検出率は ILI 患者と比べて有意に高かった ($p < 0.0001$)。EV68 の塩基配列にもとづく系統樹 (近隣結合法) では、Lineage 2 および Lineage 3 に分類され、Lineage 2 に属する株群は、以前 2008-09 年にフィリピンで検出された Lineage 2 の株群から分岐していた。Lineage 3 に属する株群は、2008-09 年にフィリピンで検出された Lineage 3 の株から分岐せず、2009 年に米国に検出された株群と近縁に位置した。

1514 検体中、379 (25%) がライノウイルス陽性であった。ライノウイルス A は 53.2%、B は 8%、C は 38.8% であった。検出の 9 割以上を占めた A、C 間でこれ以降の解析を行った。有意にリレティブリスクが高い地域を検出するクラスター解析の結果 A、C はそれぞれ異なる地域で流行していたことが示唆された。

肺炎マイコプラズマ、呼吸器細菌 (肺炎球菌、インフルエンザ菌) 感染

1. マイコプラズマ肺炎

遺伝子型別の結果、subtype 1 型が多く、その他は variant 2a と 2c だった。2a 亜型株は、ゲノム上に 6-kbp の挿入配列があり、その中に菌体表層に存在するリポ蛋白をコードする遺伝子が複数存在することが

分かった。これらが挿入されることで菌の抗原性が変化し、流行の一因となっている可能性が考えられた。また、国内で P1 蛋白のアミノ酸配列に変異がある variant 2b 菌が出現していることも確認し、抗原性が異なるため今後流行株となる可能性があると考えられた。マクロライド耐性株は 46 株/70 株 (65.7%) で、そのほとんどが小児から分離された。治療においては、マクロライド治療群では対照群 (- ラクタム単剤治療群) と比較して罹病期間に有意差が認められず、ミノサイクリン治療群のみが有意差を認め、対照群と比較して 2.5 日 (95% 信頼区間: 0.7 ~ 4.3 日) 短縮していた。

2. 肺炎球菌表面蛋白 PspA の融合蛋白の交叉反応についての研究

融合 PspA タンパク質 A、B および C のいずれの免疫血清は、各クレードの PspA に対して結合性を示した。融合 PspA タンパク質 C の免疫血清は、クレード 1 ~ 5 のいずれの肺炎球菌株に対しても高い結合性を示した。融合 PspA タンパク質 A および B の免疫血清は、クレード 3 に対しては若干低い結合性を示したが、これ以外のクレードの肺炎球菌に対しては、高い結合性を示した。マウス致死的肺炎モデルの感染実験では、融合 PspA タンパク質 C による免疫マウスでは、PspA クレード 1 ~ 5 の肺炎球

菌株のいずれを感染させた場合でも有意な生存率の改善が認められた。融合 PspA タンパク質 A および B による免疫マウスでは、PspA クレード 2、4 または 5 の肺炎球菌株を感染させた場合に有意な生存率の改善が認められた。免疫血清中の IgG の臨床分離肺炎球菌株への結合能をみたところ、融合 PspA タンパク質 A、B および C による免疫血清のいずれにおいても、ほぼ全ての臨床分離肺炎球菌株 (93.5%) に対する IgG 結合能 (結合率 10%以上) を示した。

3. 上気道感染症由来肺炎球菌の PspA 型、薬剤感受性、血清型の検討

急性中耳炎、急性鼻副鼻腔炎などの急性上気道感染症から分離された肺炎球菌分離株 251 株の解析では、PspA 型の分離頻度は PspA1 が 44.6% に、PspA2 が 49.4% に検出され、ほとんどが PspA1&2 型に分類された。PspA 型の分離頻度は、年齢、性別、分離部位、ペニシリン G に対する感受性で差を認めなかった一方、*mefA* 遺伝子陽性株、血清型 15B 株、血清型 19F 株では、PspA2 株が多く認められた。PspA 型の分離頻度は、莢膜血清型とは関連を示さなかったことから PspA を含めた肺炎球菌ワクチンは、血清型に関係なく肺炎球菌を広くカバーすると考えられた。

4. 小児市中肺炎に対する 7 価肺炎球菌ワクチン(PCV7)の影響

肺炎入院症例は人口千人当たり 3.03 人/6 か月であった。喀痰を採取した 266 例中 52 例が細菌性肺炎 (5 歳未満小児の PCV7 接種率は 72%) と診断され、内訳は肺炎球菌 18 例 (6.8%)、インフルエンザ菌 28 例、モラキセラ・カタラーリス 6 例であった。血液培養陽性肺炎球菌株は 19A、22F、15A(2 株)の 4 株であった。喀痰培養陽性 18 株のうち 16 株を解析し、PCV7 含有血清型は 6B、14、19F、9V の計 4 株 (25%) であった。今回の検討では、5 歳未満小児市中肺炎入院数と、肺炎球菌性肺炎入院数の減少傾向があり、特に PCV7 含有血清型は著明な減少を認めた。

5. 肺炎球菌とインフルエンザ菌におけるバイオフィームと莢膜の関連

Microtiter biofilm assay (MBA) の平均値はそれぞれ 0.57(BLNAS-NTHi), 0.50(BLNAR-NTHi), 0.34(BLPACR-NTHi), 0.08(Hib)であった。Hib 株の多くは NTH 株に比べバイオフィーム産生は極めて低かったが、バイオフィーム産生を有する Hib 株は PCR で莢膜が欠損していたことが確認された。また、TIGR4 *S. pneumoniae* の莢膜欠損株と野生株とのバイオフィーム産生の比較検討では、莢膜欠損株の産生するバイオフィームの厚みは野生株の約 2 倍であった。以上の結果より、肺炎球菌と

インフルエンザ菌では莢膜はバイオフィルム産生に対し抑制的に関与していることが示唆された。

D・E 考察とまとめ

本研究は年1回開催される日米医学協力研究ARI部会と連携し活動した(2013年3月シンガポール開催)。

Pandemic A(H1N1)2009 (以下A(H1N1)pdm09)インフルエンザについては、本研究組織の特徴であるウイルス学および細菌学のARI分野の基礎・臨床の研究者が協力して、疫学的データの集積・特徴的な臨床像の解析、病態の解明、ウイルスと細菌の重複感染による重症化、変異と薬剤耐性、ワクチンによる予防と新しい予防手段の開発について検討をすすめた。一方、A(H1N1)以外の新たな「新型インフルエンザ」の登場や、東南アジアをはじめ全世界で蔓延し、ヒトにおける発生からパンデミックへの危険性が高まっているA(H5N1)高原性鳥インフルエンザのモニタリングも非常に重要と考え、新たな「新型インフルエンザ」の可能性や薬剤耐性ウイルスの出現について検討した。

一方、急性呼吸器感染症の主要原因菌である肺炎マイコプラズマ、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の薬剤耐性化、菌株共通蛋白抗原の解析とワクチンへの応用、インフルエンザ菌によるバイオフィルム産生による病態の遷延化と肺炎球菌莢膜の影響などが解明され、2010年から

日本で接種が開始された7価肺炎球菌ワクチンによる小児市中肺炎の臨床像や肺炎球菌血清型への影響も検討された。ワクチン導入後の影響については、導入後すでに10年を経過している米国研究者やワクチン導入が積極的に進められているアジア(中国、バングラディッシュ)の研究者との交流により、詳細な成績も紹介され、ワクチンの有効性と課題が明らかとなった。

以下に具体的な研究成果を示す。

1. インフルエンザウイルス感染症

インフルエンザウイルスは、従来の季節型インフルエンザに加え、パンデミックを起こした2009年H1N1インフルエンザや、アジアを中心に拡がりをみせている強毒型のH5N1鳥インフルエンザなど、ヒトにおける重要な病原体の1つである。また、インフルエンザは小児や、糖尿病・気管支喘息などの基礎疾患を持つ患者を中心に重症化しやすく、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)やインフルエンザ関連脳炎/脳症など重篤な病態を引き起こす。

インフルエンザA/H1N1/2009 pdmに感染し肺炎を引き起こした患者の血清中ではG-CSF、IL-6、IL-10、IL-15、TNFが上昇したとの報告があり、また、インフルエンザ肺炎マウスモデルにおいて血清中ではIL-1、IL-6、RANTES、KC(IL-8)が上昇し、BALF中ではIFN、KC(IL-8)、RANTES、MIP-2、MCP-1の上昇が認められたとの報告があるが、局所と全身の免疫

応答の相関については明確な結論が出ていない。本研究では、同一の病原体が異なる組織へ感染した場合の生体の反応を観察するため、多臓器に感染能を持つインフルエンザ A/WSN/33(H1N1)株を使用し、さらに感染部位を明確にさせるため、肺炎群は経鼻接種法、脳炎群は脳内接種法を用いて感染させ、全身および局所のサイトカインプロフィールを検討した。肺炎群、脳炎群ともに全身では炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。一方、局所において肺炎では炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇し、脳炎では炎症性サイトカイン・ケモカインに加え抗炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇が認められ、局所の免疫応答が異なっていることが判明した。局所は病態を反映しやすく、重症感染症の治療において局所反応の重要性が示され、適切な治療を行う上で、血液のみでなく感染局所の検索による病態把握が必要であることが強調された。

これまで、ヒトインフルエンザウイルスの個体間伝播に関する研究は、フェレットを用いて行われてきた。しかし、フェレットはマウスやラットに比べ、購入費や飼育費、扱いやすさなどの観点から、最適なモデル動物とはいえない。本研究ではハムスターへの感染実験および伝播様式の検討が行われ、A/California/04/09(H1N1)は、ハムスターにおいて飛沫を介した個体間伝播を起こすことが明らかとなり、ハムスターの

インフルエンザウイルス飛沫感染モデルの可能性が示唆された。今後は、他の季節性ヒトインフルエンザを用いて飛沫伝播実験を行い、飛沫伝播に関わるメカニズムやウイルス因子の解明が期待される。

インフルエンザ対策にはワクチン接種が有効とされているが、パンデミックの発生に備えて、短期間に大量のワクチンを供給する必要があるため、従来の孵化鶏卵培養法に代わり、細胞培養法を用いた新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。MDCK 細胞はインフルエンザウイルスの分離効率及び増殖性が良いため、細胞培養インフルエンザワクチン製造に用いられる候補細胞の一つである。しかし、パンデミックワクチンを短期間大量に必要とする際には、よりウイルス生産効率の優れた細胞を開発する必要がある。I 型インターフェロン(IFN)誘導性遺伝子である IRF7 に対する shRNA を安定発現させた新規 MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させると、コントロール MDCK 細胞と比較して HA 価が 2~8 倍上昇した。また、新規 MDCK 細胞において A/PR8 株のウイルス増殖性改善による I 型 IFN 産生量への影響を調べた結果、I 型 IFN 産生制御機構と別の経路を介してウイルス産生量が有意に増加した。以上より、ウイルス高増殖性を示す新規 MDCK 細胞の樹立によって効率的なワクチンシードウイルスの分離増殖が可能となり、大量のワクチン供給体制の構築に繋がることを期待される。

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、被害が続いている。600例を超える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、これによるパンデミックが危惧されている。本研究では国内、モンゴルおよびベトナムにおいて採取された渡りガモおよびハクチョウの糞便材料および家禽の気管ぬぐい液 インフルエンザウイルスを分離同定し、その遺伝子的関連を検討した。その結果、北部ベトナムの家禽から分離されたH5N1ウイルスは、北部では近年アジアで分離されているウイルスと同じクレード2.3.2.1に、南部ではベトナムで流行しているウイルスと同じクレード1.1に分類された。さらに分離されたH6およびH9ウイルスのHA遺伝子は中国の家禽から分離されたウイルスのそれと近縁で、ベトナムの家禽の中で遺伝子再集合が頻繁に起きていることが判った。

ヒトへの感染リスクが考えられるウイルスの流行を家禽の中で抑える対策を国際連携で徹底すること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とそれらを感染させたときのウイルス増殖と宿主応答を明らかにすることにより、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知見となると考えられる。

注射によるワクチンで誘導される免疫は主に血中の中和抗体であり、ワクチン

株に対しては高いものの抗原性の異なるウイルス株に対しては低くなる。そこで本研究では、全粒子不活化ワクチン接種を受けた健常人ボランティアのワクチン接種前後の血清中和抗体に加えて、鼻腔洗浄液中中和抗体を測定し、その交叉反応を検討した。経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答は、ワクチン株と異なる株に対しても誘導され交叉中和抗体の上昇率は鼻腔洗浄液の方が血清と比較して高かった。すなわち、経鼻ワクチンによる粘膜免疫誘導では血清の中和抗体に加えて鼻腔等の粘膜への免疫誘導が可能で、変異ウイルスに対しても中和効果が期待できることが判明し、経鼻免疫の有用性が確認された。

2. 呼吸器マイコプラズマ・細菌感染症
2011年から日本において流行しているマイコプラズマ肺炎患者からは、subtype 1の*M. pneumoniae*が多く分離され、マクロライド耐性株が65.7%を占めた。この流行はこの感染症の流行周期にあたったこと、また菌の抗原変異とマクロライド耐性菌の増加などが背景にあると考えられた。今回の流行が終息した後も、再び数年後に流行が来る可能性があることが危惧された。

現在市販されている肺炎球菌ワクチンでは90を越える肺炎球菌血清型から最大23価の各莢膜ポリサッカライドが抗原として含有されている。しかし莢膜ポリサッカライドのみでは2歳未満の小児に対して特異免疫誘導できない等の欠点

がある。小児用のコンジュゲートワクチン(PCV7)が開発され、本邦でも接種率が急激に高まっており、今回の検討では、5歳未満小児市中肺炎入院数と、肺炎球菌性肺炎入院数の減少傾向があり、特にPCV7含有血清型は著明な減少を認めた。しかし、海外では、ワクチン使用後の非ワクチン型による侵襲性感染症の増加が問題となっている。

現行肺炎球菌ワクチンの欠点を補う目的で、肺炎球菌表層タンパク質抗原の一つである肺炎球菌表面タンパク質 A (PspA) による肺炎球菌臨床分離株の分類を行い、さらに PspA 融合タンパク質を抗原とするワクチンの効果を調べた。中耳貯留液、鼻汁、副鼻腔分泌液、咽頭分泌物から分離される肺炎球菌のほとんどは、PspA1 あるいは PspA2 のいずれかに分類され、PspA 型の分離頻度は、莢膜血清型とは関連を示さず、これらのことから PspA を含めた肺炎球菌ワクチンは、血清型に関係なく肺炎球菌を広くカバーすることが可能であり、次世代の肺炎球菌ワクチン抗原として有用であると考えられた。PspA1 および PspA2 を融合した融合 PspA タンパク質 C による免疫マウスでは、PspA クレード 1～5 の肺炎球菌すべての肺炎モデルにおいて有意な生存率の改善が認められ、免疫血清中 IgG は臨床分離肺炎球菌株への広域で高い結合能を示した。これらの結果から、融合 PspA タンパク質 C は新規の肺炎球菌ワクチンの有望な抗原になり得ると考えられた。

肺炎球菌とインフルエンザ菌は中耳炎、肺炎、髄膜炎など様々な感染症の重要な原因菌である。この両菌は近年感染症難治化の原因とされるバイオフィルムを産生することが明らかとなった。莢膜は細菌の病原性とバイオフィルム産生のいずれにも関与しているとされているが、本研究により、肺炎球菌とインフルエンザ菌では莢膜はバイオフィルム産生に対し抑制的に関与していることが示唆され、呼吸器細菌感染症における遷延化の病態を理解する上で重要な知見と考えられた。