

201225011B

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

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 25 年 (2013 年) 3 月

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

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 25 年 (2013 年) 3 月

目次

I. 総合研究報告書

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究 1

木村博一

II. 総合分担研究報告書

包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究 30

野田雅博

感染症発生動向調査を基盤とした重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および 46

小澤邦壽

重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究 57

木村博一

重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究 74

梁 明秀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 82

研究分担者・研究協力者（平成 22-24 年度）

研究代表者

木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター第六室長

研究分担者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所所長
調 恒明 山口県環境保健センター所長
竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部部長
野田雅博 国立感染症研究所感染症情報センター研究員
松山州徳 国立感染症研究所ウイルス第三部第四室室長
水谷哲也 国立大学法人東京農工大学農学部附属
国際家畜感染症防疫研究教育センター伝染病疫学解明部門教授
黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターセンター長
岡山吉道 日本大学医学部医学科准教授
梁 明秀 公立大学法人横浜市立大学医学部教授

研究協力者

吉田綾子 青森県環境保健センター
筒井理華 同上
水田克巳 山形県衛生研究所
荒川美果 栃木県保健環境センター
檜激(大貫)泉美 同上
塚越博之 群馬県衛生環境研究所
吉住正和 同上
小林美保 同上
昆美也子 新潟県保健環境科学研究所
小渕正次 富山県衛生研究所
平野映子 福井県衛生環境研究センター
中村雅子 同上
大内好美 滋賀県衛生科学センター
吉田時子 同上
林 賢一 同上
小村珠喜 島根県保健環境科学研究所
清田直子 熊本県保健環境科学研究所
平良勝也 沖縄県衛生環境研究所
仁平 稔 同上
宇野優香 さいたま市健康科学研究センター
神田典子 同上
竹内恵美 横須賀市健康安全科学センター

柴原乃奈	静岡市環境保健研究所
吉岡政純	京都市衛生環境研究所
菅井和子	国立病院機構横浜医療センター小児科
藤塚麻子	同上
村田宗紀	同上
宮地裕美子	同上
鈴木由美	国立病院機構下志津病院
松田俊二	国立病院機構愛媛病院
岡崎 薫	国立病院機構香川小児病院
岩崎志穂	横浜市立大学附属市民総合医療センター小児総合医療センター
石井晴之	杏林大学医学部第一内科
倉井大輔	同上
皿谷 健	同上
斎藤義弘	東京慈恵会医科大学青砥病院小児科
板垣 勉	山辺こどもクリニック
森田幸雄	東京家政大学家政学部
山下暎朗	横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学
川上志保	横浜市立大学医学部微生物学
古谷哲也	国立大学法人東京農工大学農学部附属 国際家畜感染症防疫研究教育センター伝染病疫学解明部門
安部昌子	国立感染症研究所ウイルス第三部
田原舞乃	同上
酒井宏治	同上
白戸憲也	同上
加納和彦	国立感染症研究所感染症情報センター
佐藤 弘	同上
網 康至	国立感染症研究所動物管理
加藤 篤	国立感染症研究所放射能管理室
前仲勝実	国立大学法人北海道大学薬学研究院
福原秀雄	同上
江角真理子	日本大学医学部病態病理学系病理学分野

I. 総合研究報告書

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

研究代表者 木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター第六室長

研究要旨

ほとんどの呼吸器ウイルスは、気管支炎や肺炎などの重症感染症を引き起こすが、本邦においては、重症呼吸器ウイルス感染症の実態及び病態はよくわかっていない。また、これらのウイルスに対するワクチン開発もほとんどなされていない。そこで、本研究は、重症呼吸器ウイルス感染症における包括的なウイルスサーベイランス、重症化の病態解明およびワクチン開発を目的とした以下の主な研究を行った。

1. svARI 症例由来検体のウイルス検索を試みた結果、Respiratory Syncytial ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、ヒトライノウイルス (HRV)、ヒトボカウイルス、エンテロウイルス 68 型 (EV68) およびヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV) などが本疾患へ関与していることが明らかになった。また、分子疫学解析結果から、我が国で流行している上述のウイルスは固有の遺伝学的多様性を有することが示唆された。ウイルス感染による喘鳴は、RSV、HRV および EV68 が主に関与していたことが推察された。施設内の感染症流行の svARI の原因究明を試みた結果、これらの事例は主に HMPV および HRV が原因であることが示唆された。また、HMPV 肺炎における胸部 X 線像は肺門部の陰影を特徴とすることが示唆された。さらに、ウイルス網羅遺伝子検出 (RDV) 法や次世代シーケンサーによるウイルス遺伝子解析は、不明疾患の分子疫学解析に極めて有効な方法であることが示唆された。
2. HPIV、RSV および HRV の主要遺伝子解析に、種々の遺伝子解析法を導入した。HPIV-1 および 3 は、*HN* 遺伝子、RSV は *G* 遺伝子ならびに HRV は、*VP4/VP2* 領域を解析標的遺伝子とした。時系列系統解析法に最尤法 (ML 法) ならびにベジアン MCMC 法を導入した。また、positive selection 解析や *p*-distance 解析も行った。その結果、RSV *G* 遺伝子ならびに HRV *VP4/VP2* 領域の進化速度はインフルエンザウイルス AH1 型の *H* 遺伝子と同等の速い速度で進化していることが明らかになった。一方、HPIV-1 の *HN* 遺伝子は、やや進化速度が遅く、麻疹ウイルスの *H* 遺伝子並みの速度であることもわかった。さらに、RSV *G* 遺伝子の C 末端超可変領域は、各シーズンにおいて独特のアミノ酸置換 (positive selection) が生じていることも明らかになった。
3. 全国の地方衛生研究所(地研)において、感染症発生動向調査を基にした重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査を行った。その結果、地研が数多くの気管支炎や肺炎患者の検査診断を行っていることがわかった。小児科領域において、細気管支炎や肺炎には、多彩な呼吸器ウイルスが関与することが明らかになった。また、効率的な呼吸器ウイルス RNA 抽出キットの選択に関する調査や呼吸器ウイルス遺伝子検査法(RT-PCR 法)の改良に関する研究も行った結果、各々のウイルスの RT-PCR 法にさらなる改良が必要であることが示唆された。さらに、新型コロナウイルス(HCoV-EMC/2012)の出現に備えるため、リアルタイム RT-PCR 法の開発と全国衛生研究所における検査診断体制の構築を行った。

4. 重症呼吸器ウイルス感染症の定義および実態調査に関する研究を行った。その結果、小児科領域においては、多呼吸、喘鳴、陥没呼吸、酸素飽和度および哺乳障害の指標ならびに成人領域においては、入院後人工呼吸器・昇圧剤使用および予後の指標が重要であることが推察された。重症入院下気道感染児のウイルス検索を実施した結果、患者から高率に RSV、RV および HMPV 等が分離・検出された。また、小児においては、RSV 等の初感染による重症例が多く、成人においては、COPD などの基礎疾患に HMPV や RSV の感染が加わることにより、比較的まれに重症化することが推察された。
5. HPIV3 および RSV 感染によるヒト肺線維芽細胞(HEL)の網羅的サイトカインプロファイルを行うとともにサイトカイン産生に関与するシグナル伝達経路と抗炎症薬(フルチカゾンプロピオネート)の効果に関する研究を行った。その結果、HPIV-3 と RSV 感染により、HEL からは多くの炎症性サイトカインが産生された。これらのサイトカインの産生には、IkB- α 、Akt、ERK1/2 および p38MAPK のリン酸化が重要であることもわかった。また、フルチカゾンプロピオネートは効果的に炎症性サイトカイン産生を抑制することも明らかになった。
6. 肺に特異的に存在する膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)がコロナウイルス(CV)の S 蛋白を活性化し、細胞侵入を促進させることを発見した。TMPRSS2 発現細胞では、2つの経路より CV が感染することもわかった。この結果から、TMPRSS2 とカテプシンの阻害剤の同時投与により、CV 感染を阻止できる可能性が示唆され、プロテアーゼ阻害剤カモスタットは、CV の細胞侵入を抑制することがわかった。さらに、HPIV-1 には、その増殖にトリプシン要求型の株と、非要求型の株が存在することを明らかにした。F タンパクのアミノ酸の違いを解析したが、差異は見られなかった。
7. センダイウイルスを含む多くのパラミクソウイルスにおいては、膜融合タンパク P3 位にグルタミン残基を持つことが、ヒトの呼吸器で増殖する上で重要であり、P3 位にグルタミンをもつ基質に特異性の高いプロテアーゼ(TMPRSS2 を含む)によって、多くの呼吸器感染症ウイルスが活性化を受けていることを示唆している。この性質がインフルエンザウイルスの宿主域や臓器トロピズムに影響を与えていることが示唆された。
8. コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、PIV-3-HN 全長タンパク質合成を行い、この抗原とアジュバント[poly(I:C)]をマンノースリポソームに封入し、マウスに経鼻接種を行った結果、血清中に有意な抗 HN-IgG 抗体の産生が認められた。
9. ヒトテロメラーゼ hTERT を定常的に発現するヒト肺線維芽細胞(MRC5)に、ヒトパピローマウイルス E7 またはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16 に対する特異的 shRNA を安定的に発現するクローンを樹立した。これらの不死化細胞により、今後、種々の呼吸器ウイルス分離が可能になることが示唆された。

分担研究者	
小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所所長
調 恒明	山口県環境保健センター所長
竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部部長
野田雅博	国立感染症研究所感染症情報センター研究員
松山州徳	国立感染症研究所ウイルス第三部第四室室長
水谷哲也	国立大学法人東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター伝染病疫学解明部門教授
黒田 誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターセンター長
岡山吉道	日本大学医学部医学科准教授
梁 明秀	公立大学法人横浜市立大学医学部教授

A. 研究目的

本邦において、重症呼吸器感染症による年間死亡者数は推定で 10 万人を超えていることが推定される。これらの症例の中に、少なからず呼吸器ウイルスが関与していることが推定されるが、その実態は不明であると思われる。特に、乳幼児においては、RSV やヒトメタニューモウイルス (HMPV) 感染による呼吸器感染症は重症化しやすい傾向があるが、重症感染症を引き起こすウイルスの種類や疫学には不明な点が多い。また、市中肺炎における重症度の臨床的な指標は、小児科および成人領域において定められているが、それ以外の呼吸器感染症における重症度の指標は定められていない。さらに、多くの呼吸器ウイルスの効果的なワクチンは未だに開発されていないか、

あるいは過去に開発を断念している。加えて、喘息は、本邦において増加の一途をたどっており、喘息の発症と増悪には RSV や HRV が密接に関与することが知られているがその病態には不明な点が多い。このような背景から、重症例を含む呼吸器ウイルス感染症の包括的なウイルスサーベイランス、市中肺炎以外の重症呼吸器ウイルス感染症の指標化や実態解明、呼吸器ウイルス感染症の重症化の病態解明および効果的なワクチン開発も視野に入れた研究は重要でかつ必要性が極めて高いと思われる。本研究においては、国内の呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス、市中肺炎以外の重症呼吸器ウイルス感染症の指標化、重症化の機序解明および制御に関し、全国地方衛生研究所、大学医学部微生物学教室および国立感染症研究所により以下の内容の研究を行った。

B. 研究方法

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

- 1) 各地域レベルで感染症発生动向調査等により収集された急性呼吸器感染症 (ARI) 患者検体から呼吸器ウイルス分離・検出と解析を実施し、ウイルス学的・疫学的に重症化の因果関係を明らかにした。また、代表株の系統保存・遺伝子情報の集積も行った。
- 2) 既知ウイルス感染が否定された場合あるいは起因ウイルス確定不能の場合には、ウイルス網羅的検出 (RDV) 法等の技法を用いて、原因ウイルスを究明した。
- 3) HMPV およびサフォードカルジオウイルス 3 型 (SAFV-3) の血清疫学調査を行った。
- 4) ARI 患者における気管支喘息発症リスク因子とウイルス学的要因の解析および検討を行った。
- 5) 医療施設内における ARI の感染実態を調査し、院内感染制御に関する方策を検証した。
- 6) 代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行った。

また、既知ウイルス感染が否定された場合あるいは起因ウイルス確定困難の場合、次世代シーケンサー、ウイルス網羅的検出法、等の検査診断技法を用いて、起因ウイルスの特定を試みた。

- 7) 病原体検査マニュアル (RSV, HMPV, HRV および HPIV) の作成・改定および自治体衛生研究所等との連携を通じ、側面的技術支援を行った。
- 8) 分子疫学解析法 (ML 法・MCMC 法) を駆使し、種々の呼吸器ウイルス (RSV, HPIV および HRV) の主要遺伝子の時系列系統解析を行った。また、検出株間の遺伝学的距離 (p-distance) や positive selection 解析も行った。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究

- 1) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活用し、全国 77 カ所の地方衛生研究所等を対象とした svARI に関するアンケート調査を実施した。本調査では、重症呼吸器感染症を、①気管支炎、②細気管支炎、③クループ様疾患、④気管支喘息、⑤肺炎、⑥喉頭炎、⑦気管支肺炎、⑧38°C以上の発熱 + 下気道炎と定義し、感染症発生動向調査の結果を基に、臨床症状 (発熱や下気道炎など)、検出方法 (ウイルス分離や PCR など)、検出結果 (RSV、InfV、不検出など)、さらに集団発生などの情報について調査を行った。なお、倫理面への配慮として、本研究においては、感染症発生動向調査事業に基づく検体情報を扱っており、個人情報の保護に十分配慮して行った。
- 2) 小児科および成人領域における市中肺炎以外の重症呼吸器ウイルス感染症の臨床的な指標化および実態調査を行った。
- 3) 2010 年に呼吸器症状を呈して、医療機関を受診した患者から採材された検体 (咽頭拭い液または鼻汁) から RNA を抽出後、HRV、EV は VP4/VP2 領域、RSV は F 遺伝子、PIV は HN お

よび P 遺伝子、HMPV は F 遺伝子、HBoV は NP1 領域について、PCR 法を行い、増幅された遺伝子については塩基配列の解析を行った。また、用いた primer 配列とデータベース上に登録されている塩基配列の比較なども行い、PCR による検査診断法の至適化に関する研究も行った。

- 4) 重症呼吸器ウイルス感染症患者から供試された検体 (各種臓器・組織検体) から核酸配列を次世代シーケンサーの解析能力を駆使して網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログを作製した。
- 5) 未知のウイルスを含んだ検体を培養細胞に添加によるウイルス感染の有無を判定可能なシステムを構築し、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法によるウイルス感染マーカー遺伝子の検索を行った。
- 6) 主症状が呼吸器症状および筋痛症の不明疾患由来検体 (咽頭・便検体) を用い、網羅的病原体検索を試みた。抽出 DNA から Genomic DNA sample prep kit (Illumina) を用いて Illumina DNA ライブラリーを作製し、そのライブラリーを解読した。病原体配列のアライメントは、ClustalW、系統樹作成は neighbor-joining (NJ) 法で行った。
- 7) 新型コロナウイルス (HCoV-EMC/2012) の出現に備えるため、迅速かつ高感度なリアルタイム RT-PCR 法の開発、検査診断マニュアルの作成および全国衛生研究所における検査診断体制の確立を行った。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

- 1) HPIV3 感染 MRC-5 細胞によって惹起されるサイトカインならびにサイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構をマルチアレイビーズ法によりそれらの網羅解析を行った。
- 2) RSV 感染 MRC-5 細胞によって惹起されるサイトカイン、サイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構およびコルチコステロイドの作用機

序に関する解析を行った。

3) HRV 感染 MRC-5 細胞によって惹起されるサイトカイン、サイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構およびコルチコステロイドの作用機序に関する解析を行った。

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

1) ヒトパラインフルエンザウイルス (1 型、2 型および 3 型) の膜融合タンパク質 (F タンパク質) を活性化するプロテアーゼを明らかにするとともに、GFP を組み込んだパラインフルエンザウイルス (1 型、2 型および 3 型) の増殖機構を明らかにした。ウイルスの増殖は、ブランク法、GFP から発する蛍光解析によって解析した。また、ウイルス蛋白のアミノ酸レベルでの解析は、それぞれのウイルス蛋白をコードする遺伝子解析によって行った。

2) ウイルス感染を容易に検出するために緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する組換えセンドライウイルス (SeV-GFP) を用いた。細胞は、通常の Vero 細胞、ヒト TMPRSS2 を発現する Vero 細胞 (Vero/TMPRSS2)、通常の HeLa 細胞ならびにマウス TMPRSS2 を発現する HeLa 細胞 (HeLa/mouseTMPRSS2) を利用した。SeV-GFP を Vero、Vero/TMPRSS2、HeLa および HeLa/mouseTMPRSS2 細胞へ感染させ、経時的に感染の広がりや蛍光顕微鏡で観察した。SeV の HN タンパク質、ならびに F タンパク質を発現するプラスミドを構築し、両プラスミドを赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現するプラスミドとともに Vero 細胞に発現させ、膜融合能 (細胞融合) の程度を蛍光顕微鏡下で観察した。TMPRSS2 の効果を解析するために一部の細胞には、TMPRSS2 を発現するプラスミドを同時に導入した。トリプシン添加による効果を対照として解析した。開裂部の P2 位 (アミノ酸 115 番目)、P3 位 (アミノ酸 114 番目) にアミノ酸変異

を導入した F タンパク質を用いて上記の膜融合解析を実施した。導入した変異は、Q114A、Q114S、Q114N、Q114V、Q114I、S115R および S115V である。

3) HIPV1 (09-2272 株)、HPIV2 (09-2331 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt)、Vero、Vero/TMPRSS2 細胞へ感染させて、SDS-PAGE ならびに Western blot 解析によって、F タンパク質を検出し、F タンパク質の開裂について解析した。

5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

1) VSV シュードタイプウイルスの表面に、それぞれのコロナウイルス (SARS、NL63、229E および 229E の臨床分離株) の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。また、TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞に感染させ、TMPRSS2 感受性の比較をおこなった。さらに、市販のプロテアーゼ阻害剤で処理した細胞へのウイルスの感染を調べ、TMPRSS2 の活性阻害剤の検索を行った。

2) VSV シュードタイプウイルスの表面に、それぞれのコロナウイルス (SARS、NL63) の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。これらのシュードタイプウイルスは感染細胞で GFP を発現するので、容易に感染価を調べることができる。また、本物の SARS-CoV を用いて細胞に感染させ、侵入したウイルスを Real-time PCR で検出することにより、感染価を定量した。今回は HeLa 細胞に TMPRSS2 とコロナウイルスのレセプター (ACE2) を発現させた細胞 (HeLa-ACE2-TMPRSS2) と、TMPRSS2 非発現細胞 (HeLa-ACE2) を共にウイルスに感染させ感染価を比較した。また、肺由来の細胞株 (Calu-3、BEAS2B、MRC-5、A549、HPAEPiC) に SARS コロナウイルスを感染させ、感受性を比較した。さらに siRNA を用いて Calu-3 細胞の

TMPRSS2 をノックダウンし、SARS コロナウイルスの感受性を調べるとともに肺胞由来細胞でのプロテアーゼ依存性を調べた。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

- 1) コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN を構築し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、抗原となる PIV-3-HN タンパク質全長タンパク質の合成を行った。タンパク質精製はグルタチオンビーズによるカラム法を用いた。GST-PIV3HN 間の切断は TEV プロテアーゼを用いて行った。また、DNA ワクチンへの応用を考慮し、動物細胞コドンの最適化した PIV-3-HN の全長 cDNA を合成した。
- 2) 正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HP16-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作成した。作成したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。
- 3) アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化因子導入後、Embryoboid body 形成法を用いて細胞分化を行った。ウイルス感受性試験では RSV および PIV3 を MOI=1 で標的細胞に感染させ、48 時間後に細胞障害性および合胞体の形成を観察した。また感染細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を用いてウイルス遺伝子の発現レベルを測定した。
- 4) マンノース被覆リポソームを PBS で希釈後、SDS で脂質膜破壊サンプルバッファーと混合し、100°C で加熱処理した。リポソームのコレステロール量が 5 もしくは 10 μg になるように、ゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS (Wako, 178-00551) で染色し、ルミノ・イメージ・アナライザー LAS-3000 (FULIFILM) にとりこみ、汎用解析ソフト Multi Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

C. 研究結果

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

1) ARIs ウイルス分離・検出成績

山形県、沖縄県、栃木県、山口県、新潟県、滋賀県、島根県、群馬県、福井県、熊本県、青森県、千葉市、京都市、静岡市、さいたま市および横須賀市のそれぞれの県・市域における svARIs ウイルスサーベイランス(2010 年 1 月～2012 年 11 月末)の結果、RSV : 638 株、HMPV : 616 株、HRV : 1,210 株、HPIV : 947 株、HCoV : 55 株および HBoV : 112 株等がそれぞれ分離・検出された。その他、エンテロウイルス(EV)、サフォードカルディオウイルス(SAFV)、パレコウイルス、インフルエンザウイルス(FluV)およびアデノウイルス(AdV)等の ARIs ウイルスが分離・検出された。

2) RSV

2-1. 山形県域における流行期は毎年 11-12 月期であり、明らかな季節性の流行様相を示す。いっぽう、沖縄県域における流行期は通年で、明らかな季節性は示さない。また、他の地域の流行期を比較すると若干の地域差がみられる。

2-2. 我が国の流行ウイルス株の主要な genotype は subgroup A では GA2、subgroup B では BA が主流であり、地域内ではいずれも遺伝学的に近縁な株の感染流行である。なお、現在 genotype GA2 はさらに進化した genotype NA1 に分類される。

2-3. 千葉市域では、subgroup A および B の主流はそれぞれ genotype GA2 および BA で、他域と同様であるが、そのほかに subgroup A 分類株で genotype GA5 および Subgroup B 分類株で Subgroup A genotype GA2 のクローンが検出された。

2-4. 栃木県域の subgroup A 分類株は genotype NA1 に分類された。また、一部の subgroup A 分類株では、C 末端超可変領域に 72 塩基の重複を有す

る株が検出され、genotype ON1 に分類された。山口地域の subgroup A 分類株の一部でも、C 末端超可変領域に 72 塩基の重複がみられた。

2-5. 青森県、群馬県および熊本県域における検出株の主要タンパク抗原をコードする G 遺伝子 C 末端超可変領域について positive selection site を検索した結果、subgroup A では 6 ヶ所(Asn250Ser、Met262Glu、Asn273Tyr、Leu274Pro、Arg297Lys および Arg297Glu)、subgroup B では 1 ヶ所(Leu237Pro)の site があり、将来新たな変異が生じる可能性が示唆された。また、これら検出株の進化速度を最尤法により算出した結果、Subgroup A では 1.92×10^{-3} substitution/site/year、Subgroup B では 3.59×10^{-3} substitution/site/year であった。

3) HMPV

3-1. 山形県域における流行期は毎年 3-4 月期であり、明らかな季節性の流行様相を示す。いっぽう、沖縄県域における流行期は明らかな季節性を示さない。また、他の地域の流行期を比較すると若干の地域差がみられる。

3-2. 分離・検出株の遺伝子解析結果から、我が国で流行しているウイルス株の主要な subgroup は A2、B1 および B2 に分類される。

3-3. 島根県域の高齢者福祉施設 2 ヶ所で発生した集団 ARIs 症例から subgroup B2 分類株が高率に検出された。同時期、近隣から採取されたサーベイランス検体からも、同型ウイルスが多数検出された。

3-4. 福井県域の検出株の F 遺伝子の一部について positive selection site を検討したが、いずれの株も positive selection site は確認されない。

3-5. 京都市における症例検討の結果、好発年齢層は 0~2 歳、好発月は 3 月、主たる臨床所見は発熱(38°C 以上)、発咳であり、X 線画像診断で肺野所見が顕著な症例では重症化傾向を示す。

4) HRV

4-1. 我が国の流行ウイルス株の主流は species A および C 分類株であり、species B は少数である。流行はいずれの地域でも通年でみられ、流行株は遺伝学上、多様な type に分類される。

4-2. 熊本県および栃木県域で検出された HRV-C 株について、NJ 法および ML 法による系統樹、p-distance および positive pressure 解析の結果、検出株は 11 遺伝子型に分類され、これらの株は 1870 年代前半に分岐した可能性が示唆された。

4-3. 通常、HRV 感染症は予後良好の ARIs と考えられるが、RSV 感染と同様、喘鳴、慢性喘息等の増悪因子となりうることを示唆される(後述)。

5) HPIV

5-1. 山形県域における 2002-2011 年間の HPIV 1 型(-1)分離成績から、分離株数は隔年で増多傾向を示したが、流行の明瞭な季節性はない。HPIV-1 好発年齢は 2-4 歳で、HPIV-3 患児年齢に比し、やや高い傾向を示す。

5-2. HPIV-2 は HPIV-1 が増多傾向を示した翌年の秋季から冬季に多数分離される傾向を示す。好発年齢は 3-5 歳であり、HPIV-3 好発年齢に比し、やや高い年齢を示す。

5-3. HPIV-3 は毎年 5-7 月期をピークとする、明らかな季節性の流行様相を示す。分離代表株の遺伝子解析結果から、流行株は 3 つの clade に分類される。好発年齢は 2 歳以下の乳幼児が 50% 以上を占め、低年齢児 svARIs の重要な原因ウイルスである。

5-4. 山形県域の 2002-2009 年の HPIV-1 分離株 182 株について、HN 遺伝子の塩基配列(1,233bps)を解析した結果、分離株は大きく 2 つのクラスターに分類され、これらは 1980 年代後半に分岐した可能性が推測された。

5-5. 山口県域における HPIV-4 検出 22 株の遺伝子解析結果から、これらは subgroup A:16 株および subgroup B: 6 株にそれぞれ分類された。臨床所見は気管支炎、気管支肺炎、喘息等の重症化傾

向を示す。

5-6. 山形県域における HPIV-4 サーベイランスの結果、2011年9月～2012年2月にかけて、37例の HPIV-4 陽性例(HPIV-4a と4b の混合流行)を確認し、地域流行があったことが示唆された。

6) HBoV

6-1. 沖縄県、滋賀県、福井県、栃木県および千葉市域から集積された症例の 71.4%は下気道炎症状を呈す。また、これら症例の 53.6%では他のウイルスが同時に検出された。

6-2. 各域における検出株の全長ゲノム(5,299 bp)を解析した結果、わが国で検出される HBoV は3つのグループに分類される。

6-3. 各域から集積された症例の主な臨床所見は呼吸器症状、一部で消化器症状を示し、初感染は5歳以下の乳幼児である。全 ARIs 症例の5%以内の原因ウイルスと推定される。流行期は地域によって若干の異同はあるが、おおむね 2-6 月期である。

7) HCoV

7-1. 主要臨床所見は上気道炎、発熱で、予後は比較的良好である。全 ARIs 症例の約 3～5%の原因ウイルスと推定される。流行時期は地域、株によって異なった傾向を示したが、沖縄県域では他のウイルスと同様に明確な流行時期は見いだせない。

7-2. 新潟県域では NL-63 および OC-43、熊本県および沖縄県域は 229E、HKU1 および OC-43 にそれぞれ分類される株が主流である。

8) EV68

8-1. 山形県域の 2005-2010 年および山口県域の 2010 年の検討結果から、EV68 の流行は地域、年により若干の差異がみられる。流行は概ね各年 8-10 月期である。

8-2. 山形県域の分離・検出株の分子疫学解析を試みた結果、流行株は3つの Lineage に分類され、Lineage3 分類株では Fermon 株に比べ 3 塩基の

欠損がみられる。それぞれの Lineage に属する株はいずれも遺伝学的に近縁な株である。

8-3. 山口県域の検出株について VP4/VP2 領域(390nt)の遺伝子解析を行った結果、検出株間では 90～100%の相同性を示し、遺伝学的に近縁の株の流行である。

8-4. 検査診断に際し、ウイルス分離培養では診断困難な症例も多く、RT-PCR の活用等、検査診断系の選択に留意するべきである。

9) SAFV

9-1. 山形県域の SAFV-2 サーベイランスを実施した結果、2009年8-12月の流行を捕捉した。臨床的にはコクサッキーウイルス B 型に似た咽頭炎、扁桃炎、ヘルパンギーナ症状を示し、svARIs の原因ウイルスであることが示唆された。

9-2. SAFV-3 群馬県分離株を用いた血清疫学調査の結果、群馬県域の健常人では5歳以上の群ではすべて中和抗体を保有することから、5歳未満の乳幼児期にほぼ全ての人が SAFV-3 既往であることが推測された。

10) HPeV

10-1. 2008年6-8月に山形県南部域で発生した若年成人における流行性筋痛症例から、HPeV3 が検出、同定された。HPeV3 は小児の ARIs 等の原因ウイルスとして注目されるが、本症例は成人疾患の原因ウイルスとした初めての報告である。

11) 検査診断系

11-1. RSV および HMPV 検査診断に Real-time RT-PCR の応用を検討した。構築した系は、感度、特異性、等において良好な成績を示し、サーベイランス検査へ導入することにより、検査の効率化が図られると思われる。

11-2. 起因ウイルス確定不能の svARIs 症例について、次世代シーケンサーやウイルス網羅的検出(RDV)法等の技法を応用した起因ウイルスの特定を試み、Parecho ウイルス、SAFV 感染と診断された。

12) FulV サーベイランスと関連した svARIs 疫学

12-1. 山形県域における RSV、FulA、HMPV および HPIV-3 流行の季節性について解析を試みた。RSV:11-12 月頃、FulA:1-翌 3 月頃、HMPV:3-4 月頃、HPIV-3:5-7 月頃、の順に流行のピークがみられ、小児の svARIs 原因ウイルスの流行疫学を明らかにした。

12-2. 沖縄県域の新型インフルエンザ(A/H1pdm)流行前、中および後期の svARIs ウイルス分離・検出動向を検討した。流行前、中および後期の検出 svARIs ウイルスは各期で種類、頻度等、類似の傾向を示す。

12-3. 新潟県域における A/H1pdm 流行前、中および後期の svARIs ウイルス分離動向を検討した。その結果、A/H1pdm の流行終息期の HPIV、RSV および HMPV 分離株数は、流行前/後期に比し、増加傾向を示した。

13) 側面的技術協力等

13-1. 自治体衛生研究所等の技術者を対象としたウイルス研修(事業主体: 国立保健医療科学院)等に、ウイルス感染症検査診断、ARIs サーベイランス等の講師として参加協力した。

13-2. ARIs ウイルス感染症に関する病原体検出マニュアル 6 編を公開した。

13-3. ウイルス感染症の検査診断に関する基礎知識および技術の解説書を刊行した。

[小児科臨床小グループ]

1) 下気道炎患児からのウイルス検索を実施した結果、RSV、HRV、HPMV、HPIV、HBoV および HCoV 等の多種 svARIs ウイルスが分離・検出された。

2) RSV 感染による喘鳴発症機序要因を検討するため、分離・検出株について分子生物学的検討の結果、喘鳴発症の有無とウイルス株の各領域遺伝子との間には明らかな関連は見いだせない。

3) 検出ウイルスと臨床像等の関連について、症例比較検討を試みた結果、RSV あるいは HRV 単

独感染患児の年齢比較では RSV 感染例が有意に低年齢で、酸素投与処置例数も有意に多い。

4) HRV 単独感染例と RSV/HRV 重複感染例の呼吸状態に関する症例検討を試みた結果、後者は前者に比し有意に悪い。低年齢児の RSV 感染入院例では初回喘鳴が顕著であり、気道過敏性を有す児では HRV の重複感染により重症化傾向を示す。HRV 感染は重要な喘鳴悪化要因と結論される。

5) 気管支喘息患児の喘息発作時におけるウイルス検索を実施した結果、上述した 1. と同様に多種類の ARI ウイルスが検出され、また発作毎で検出ウイルスは異種である。

6) 2008 年 7 月～2010 年 5 月に入院加療を行った乳幼児 RSV 感染例について、退院後の喘鳴出現状況を後方視的に検討した。入院中喘鳴を認めた例では、退院後、短期間で喘鳴再出現し、家族喘息歴も有意に高い。RSV 罹患後 40% の児では喘鳴が出現し、入院中の喘鳴やロイコトリエン拮抗薬内服の有無、月齢要因では有意差を認めない。

7) 急性喘鳴や喘息増悪に関する種々の svARIs ウイルスと臨床所見等の関連を検討した。RSV 単独感染例および HRV 単独感染例の比較では、年齢および診察時の SpO₂ 最低値はそれぞれ RSV 感染例で有意に低く ($P < 0.05$)、酸素投与の有無は RSV 単独感染例で有意に多い ($P < 0.05$)。HRV 単独感染例および RSV・HRV 重複感染例の比較では、呼吸状態は RSV・HRV 重複感染例で有意に悪い。

8) これまでの研究知見を基に、小児科領域における svARIs の臨床的定義に関する研究を行った。詳細は後述する個別報告書(小澤邦壽; 研究分担者)を参照願いたい。

[重度心身障害児(者)施設小グループ]

1) 重度心身障害児(重心)病棟内では ARIs をはじめとする感染症が頻回(0.5～1 回/年)流行し、

とくに ARIs 流行ではその多くが原因不明であった。本研究により、国立病院機構愛媛病院では 11 回の svARIs 流行において 7 回(診断率: 64%)、同下志津病院では 4 回の svARIs 流行において 3 回(診断率: 75%)で、原因 svARIs ウイルスを診断した。

- 2) 両施設で検出された svARIs ウイルスは、HRV:4 回、HMPV-subgroup A2 および -B2:3 回、HPIV-1:2 回、EV:1 回、HCoV-HKU 1:1 回で、施設内 svARIs 流行には多種類の ARI ウイルスの関与が明らかとなった。いっぽう、これまで両施設ともに RSV および HBoV の流行はみられていない。
- 3) 主たる svARIs 流行時期は 10 月-翌 3 月期の間が多い。一部事例では愛媛病院の HRV 流行が 8 月に、愛媛および下志津病院で HMPV 流行が 6 月と 9 月に見られ、少なくとも HRV と HMPV では、一般にいわれている流行時期と異なる時期にも流行がおこることが示された。
- 4) それぞれの流行例について検出ウイルス、臨床所見等を検討した結果、ウイルス種で特徴的な臨床所見が観察される。すなわち、HRV および HCoV ではいずれも流行性は高いが、症状は軽く、有症期間は数日間ののち回復する傾向を示す。EV では流行性は低い、肺炎の合併が多く重症化する傾向を示した。HMPV および HPIV では中等度の流行性を示し、症状はいずれも発熱が 1 週間程度持続し、気管支炎・肺炎の合併が多く見られる。特に、HMPV は発熱初期の血液中の単球増加と X 線画像診断で肺門部を中心とした肺炎像の出現が特徴的である。これらのウイルス感染は健常人では一般に軽症で経過し、予後は良好とされているが、重症病棟では重症化する傾向が見られる。
- 5) HPIV-1 流行時に発熱がみられた患者 21 名の発症初期および回復期の血清中サイトカイン 27 種を測定した。発症初期に IL-1ra・IP-10・

MCP-1(MCAF)の上昇、IL-8 の低下が認められた。臨床的意義について検証中である。

- 6) インフルエンザを除き、svARIs ウイルスの完全な予防薬・治療薬は無く、重症病棟内での注意すべき流行防止対策(飛沫、接触感染による流行防止)措置は (i)普段から面会者・職員・外泊者によるウイルスの持ち込みを極力防止する、(ii)初期発症者の感染隔離とスタンダードプロセーションに基づいた医療措置を徹底する、(iii)病棟内の未感染者に対する感染防止策(逆隔離、手指消毒)を早期に実施する、(iv)感染コントロールチームをとおして病棟内、病院の体制(病棟閉鎖など)の早期決定を図る、などと結論される。
- ## 2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究
- 1) 77 の地方衛生研究所等のうち、svARI の検査診断を行わない 10 施設を含む 69 施設から回答が得られた (回答率 89.6%)。アンケート調査の結果、得られた 2007 年度における総検体数は、2,481 検体であった。一つの地方衛生研究所で検査された svARI 由来の検体は、平均で 36 検体であったが、検体数には施設間で大きなばらつきがあった (0 から 222 検体)。また、冬期や春期において検体数が、多くなる傾向が見られた。一方、2007 年度において、最も多く検出されたウイルスは、InfV であり、全体の 10.0%であった。次いで、RSV も多く検出されており、HMPV などが原因となることも明らかとなった。一方で、全体の 60%以上の検体では、ウイルスが検出されておらず、原因が不明となっている検体が数多く存在することも明らかとなった。また、秋期から冬期にかけての検体数の増加は、InfV や RSV の流行によることが推測された。
 - 2) Human metapneumovirus の F 遺伝子の配列と primer 配列の比較では、1st primer set の配列の 2 カ所程度に変異のある配列があり、効率の低下が起りうると考えられた。RS virus の N 遺伝

子では、forward, reverse primer とともに 4, 5 カ所の塩基置換が存在したため検出不能となる変異ウイルスが多く存在すると考えられた。表面抗原遺伝子のデータベース上の配列を alignment すると比較的保存された配列を見いだすことが出来たため (data not shown)、表面抗原遺伝子を標的とした primer の設計は可能であると考えられた。

- 3) 呼吸器感染症が疑われ、病原体が検出できなかった症例について、網羅塩基配列解読による病原体検出を行った。結果として、Human parechovirus (HPeV) に類似したゲノムを見出すことができた。さらに、HPeV 全長配列の確定を行った。確定した全長配列の polyprotein 領域 (ATG-stop codon: 6534 nt) の系統樹解析により、HPeV-3 に非常に近い HPeV であることが分かった。
- 4) フラビウイルス科に属する Yokose virus を Vero 細胞に感染させ、ISGs の感染細胞と非感染細胞における発現の差を検討した。まず、感染後 24 時間で Viperin, Mx1, Mx2, OAS-1, OAS-2, OAS-L, IFN- β , ISG5, Herc5 および CXCL10 の検出を試みたところ、viperin と OAS-L では非感染細胞において検出できなかったのに対して、感染細胞では容易に増幅されていた。しかし、その他の ISGs では非感染細胞と感染細胞の有意な差は認められなかった。以上の結果から、Yokose virus が Vero E6 細胞に感染したときには、ISGs の中でも Viperin と OAS-L は感染マーカーの候補となり得ると考えられた。次に、Vero E6 細胞に様々なウイルスを感染したときに Viperin と OAS-L の発現が誘導されるか否かについて検討した。まず、canine parainfluenzavirus, Mammalian orthoreovirus 1, Equine herpesvirus 1 について検討したところ、canine parainfluenzavirus, Mammalian orthoreovirus 1 感染細胞では、Viperin と OAS-L の発現が誘導さ

れていたのに対して、Equine herpesvirus 1 感染細胞では誘導されなかった。さらに、ヒト検体から分離された Human adenovirus 1 と Human coxsackievirus A16 を各種細胞 (Vero E6, Caco-2, MRC5, Hep-2, A549, RD-18S) に再感染させ、細胞から RNA を抽出し、ISGs について PCR を行ったが、これらのウイルスと細胞の組合せでは、Viperin や OAS-L は感染細胞と非感染細胞の間で差は認められなかった。しかし、Human adenovirus 1 を MRC5 細胞に感染させた場合には、OAS-1 と Mx1, Mx2, CXCL10 の発現誘導が認められ、A549 細胞では Herc5 が発現した。また、Human coxsackievirus A16 を MRC5 細胞に感染させたときには CXCL10 が発現していた。このように、Viperin とは別の ISGs を感染マーカーとして用いることが可能なことが示唆された。

- 5) ヒトライノウイルス (HRV) の VP4/VP2 領域において、株間の遺伝学的距離 (p -distance) を基にしたタイピング法を開発した。その結果、HRV の種によらず、 $<10\%$ divergence により、各タイプの同定が可能であることが示唆された。
- 6) 新型コロナウイルス (HCoV-EMC/2012) に対する高感度・迅速なリアルタイム RT-PCR 法の開発、マニュアルの作成および標準物質の配布により、全国の衛生研究所でこのウイルスの検査診断体制が確立された。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

- 1) 感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-1 β , IL-6, TNF- α 、抗炎症性サイトカインの IL-1ra, Th1 サイトカインの IFN- γ および IL-2, Th2 サイトカインの IL-4, IL-5 および IL-10、造血因子の G-CSF および GM-CSF, 好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10, 好酸球遊走サイトカインの eotaxin, および RANTES 等、多くのサイトカインが有意に産生された。

2) PIV 感染により、I κ B、および p38 MAPK のリン酸化が有意に増強したが、Akt のリン酸化は増強しなかった。さらに、I κ B、および p38MAPK のシグナル伝達経路とサイトカイン産生との関係について、それぞれのシグナルリン酸化の特異的阻害剤(BMS-345541 および SB203580)を用いて調べたところ、HPIV によって誘導された多くのサイトカインの産生が有意に阻害された。

3) RSV 感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、抗炎症性サイトカインの IL-1ra、Th1 サイトカインの IFN- γ および IL-2、IFN- λ 1a、Th2 サイトカインの IL-4、IL-5、IL-10、および IL-13、造血因子の G-CSF および GM-CSF、好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10、好酸球遊走サイトカインの eotaxin、および RANTES 等、多くのサイトカインが有意に産生された。これらのサイトカイン産生はコルチコステロイドの一種である fluticasone propionate により有意に抑制された。また、RSV 感染により、Akt、p38MAPK、ERK1/2、および I κ B α のリン酸化が有意に増強した。これらのシグナル蛋白のリン酸化は fluticasone propionate により有意に抑制されたが、I κ B α のリン酸化は阻害されなかった。

4) HRV 感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの IL-6、TNF- α 、Th1 サイトカインの IL-12、Th2 サイトカインの IL-5、IL-10、および IL-13、好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10、単球遊走サイトカインの MCP-1、増殖因子である PDGF-bb および VEGF 等、多くのサイトカインが有意に産生された。これらのサイトカイン産生はステロイド剤である Fluticasone propionate により有意に抑制された

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

1) パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2130 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 08-1869 株、

ならびにパラインフルエンザウイルス 3 型 09-1547 株は、Vero 細胞でトリプシン非依存的に多段階増殖し、Vero 細胞に多核巨細胞形成を伴う強い細胞変性 (CPE) を引き起こした。一方、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 09-2331 株、パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株ならびに SeV-GFP は、Vero 細胞で (トリプシンの添加なしでは) 多段階増殖せず、Vero 細胞に明らかな CPE を引き起こさなかった。Vero 細胞の場合とは異なり、Vero/TMPRSS2 細胞を用いた場合には、全てのウイルス株が、多段階増殖し、Vero/TMPRSS2 細胞に強い CPE を引き起こした。Vero/TMPRSS2 細胞では、全ての株が多段階増殖し、強い CPE を引き起こしたが、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株、および SeV-GFP 感染性細胞においては、多核巨細胞形成は、見られなかった。全てのウイルス株が、Vero/TMPRSS2 細胞でプラークを形成したが、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 09-2331 株、パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株、ならびに SeV-GFP は、Vero 細胞ではプラークを形成しなかった。

2) パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) 間において、F 遺伝子解析の結果、F タンパクの開裂部位におけるアミノ酸配列の違いはみられなかった (ともに塩基性アミノ酸は 1 つしかなく、すなわち Furin 認識モチーフを有していなかった)。パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) の Ka/Ks 値の解析結果から、HN、P および C タンパク質にアミノ酸が特集積していることが明らかになった。一方、M タンパク質のアミノ酸配列は同一であった。また、N、F あるいは L タンパク質のアミノ酸配列も非常に良く保存されていた。パラインフルエンザウイルス 1 型 2

- 株 (09-2130 株、09-2272 株) 間において、F タンパク質には、7 個のアミノ酸置換が、HN タンパク質には 24 個のアミノ酸置換が見られた。
- 3) パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) の F タンパク質ならびに HN タンパク質の立体構造モデルを作製できた。株間に見られたアミノ酸置換の場所を立体構造モデル上にマッピングすることができた。
 - 4) SeV-GFP は、Vero 細胞や HeLa 細胞においては、感染はするものの、最初に感染した細胞から次の細胞へと感染が拡大することはできなかった。一方、Vero/TMPRSS2 細胞ならびに HeLa/mouseTMPRSS2 細胞では、感染が効率よく拡大し、SeV-GFP が多段階増殖することが明らかになった。
 - 5) 開裂部の P3 位 (アミノ酸 115 番目) の変異 (Q114A、Q114S、Q114N、Q114V および Q114I) では、いずれの場合も 20~50% 程度の膜融合能の低下が起こったが、その程度は、トリプシンによって F タンパク質を活性化させた場合も、TMPRSS2 による場合も、同等であり、P3 位のアミノ酸が Q であることは、TMPRSS2 で開裂性を受けることに重要ではあるものの、TMPRSS2 特異的ではないと考えられた。一方、開裂部の P2 位 (アミノ酸 115 番目) の変異 (S115R および S115V) では、TMPRSS2 に依存した膜融合の方が、トリプシンに依存した膜融合に比較して、強く低下することが明らかになった。
 - 6) HIPV1 (09-2272 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt) を Vero あるいは Vero/TMPRSS2 細胞に感染させて培養液にトリプシン添加、あるいは非添加の状態では培養後、F タンパク質を SDS-PAGE ならびに Western blot 法にて解析した。その結果、HIPV1 (09-2272 株)、HPIV3 (09-1835 株)、HPIV4 (ATCC)、SeV-RFP(wt) のすべての F タンパク質が、トリプシン非依存的に TMPRSS2 によって開裂することが明らかになった。
5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究
- 1) SARS と NL63 のシュードタイプウイルスの TMPRSS2 発現細胞への感染価は非発現細胞と比較して、3~5 倍高くなっていた。229E では TMPRSS2 発現細胞で 1.5 倍程度感染価が高くなったが、臨床分離 229E ではさらに 3 倍程度高くなることがわかった。
 - 2) セリンプロテアーゼ阻害剤 (Camostat) とシステインプロテアーゼ阻害剤 (E64d) を同時に作用させることにより、TMPRSS2 発現培養細胞へのこれらのコロナウイルス侵入を完全に阻止できることも明らかになった。
 - 3) SARS と NL63 のシュードタイプウイルスの HeLa-ACE2-TMPRSS2 への感染価は HeLa-ACE2 と比較して、3~5 倍高くなった。しかし Calu-3 細胞への感染を、これらシュードタイプウイルスでは全く確認することができなかった。一方、本物の SARS、NL63 は HeLa 細胞に良く感染できたが、Calu-3 細胞へは SARS のみが感染することができた (Hela 細胞の 1/1000 程度の効率で)。
 - 4) SARS は Calu-3 細胞に感染できることがわかったので、この細胞が TMPRSS2 を利用して細胞侵入していることを調べるために、siRNA を用いて TMPRSS2 をノックダウンし、SARS を感染させ、Real-Time PCR で感染価を測定した。結果、TMPRSS2 を抑えることにより、ウイルスの感染も 1/6 に抑えられることがわかった。また、前回の報告で、セリンプロテアーゼ阻害剤 (Camostat) が TMPRSS2 を特異的に抑えることを示したが、今回は Calu-3 細胞での SARS 感染阻止効果を調べた。その結果、Calu-3 への SARS の感染は Camostat により 1/10 程度に抑えられることがわかった。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

- 1) 真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント PIV3-HN 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-GST ベクターに PIV3-HN 全長 cDNA をサブクローニングした。次に全自動コムギ無細胞系タンパク質合成装置 PROTEMIST-DT-II を用いて GST 融合 PIV3-HN タンパク質の大量合成を行った。合成した GST 融合 PIV3-HN タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズによるカラム法を用いて精製し、TEV プロテアーゼを用いて GST タグを切断した。その結果、PIV3-HN タンパク質の可溶性が顕著に低下した。
- 2) 従来の方法では、抗原タンパク質が拡散してしまうため、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に直接的に抗原を運ぶことが困難であった。しかし、マンノース被覆リポソーム内に抗原を封入することで、マンノースレセプターを有する抗原提示細胞に、効率的に抗原を取り込ませることが可能となる。そこで我々はマンノース被覆リポソーム (Mannose coated liposome: MCL) を用いたワクチンデバイスを開発するため、コムギ無細胞系を用いて作製した高濃度 HN タンパク溶液 (565 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いたリポソームの製造を試みた。タンパク質封入後の PIV3-MCL を 1 μm フィルターに通過させ、タンパク凝集物を除去した。次に確認のために SDS でリポソーム脂質膜を破壊後、コレステロール量を測定し、4 mg chol./mL に調製した。抗原封入リポソームを 4 μg chol./mL に調製し、動的光散乱式粒径分布測定装置 LB-500 (HORIBA) にて粒度分布測定した。Empty-MCL の平均粒径は 519 nm、HN-MCL は 882 nm となった。HN-MCL は Empty-MCL に比べ凝集傾向が強く、二次粒子が生成し、このような数値が測定され

たと考えられたが、抗原としての機能は保持されていると考えられる。

- 3) PIV3 感染症を阻止できるモノクローナル抗体を作製するため、コムギ無細胞系を用いて作製し、PIV3-HN 全長タンパク質を BALB/c マウスにアジュバントとともに足底に免疫し、4 週間後に脾細胞を分離し、マウスミエロマー細胞を用いたハイブリドーマ作製に成功した。
- 4) 正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクター、pLenti6_TERT, pLenti6_HPVI6-E7, Lenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したウイルスベクターを MRC-5/TERT 細胞に感染させ、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 100 回以上の分裂が可能な 3 株の不死化 MRC-5 細胞の誘導に成功した。
- 5) 広いウイルス感染トポロジーを有する細胞を樹立する目的で、アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化子導入し、Rhesus Monkey Stem Cell (rSC) を作成した。ウイルス感染感受性試験により、rSC は RSV と PIV3 に感染し、多核細胞や合胞体を形成することが確認された。また、感染細胞から RNA を抽出し、RSV G 遺伝子および PIV3 HN 遺伝子領域の RT-PCR を行ったところ、ウイルス転写産物を確認した。

D. 考察

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

- 1) 衛生研究所グループは、それぞれの地域の ARIs ウイルスサーベイランスを実施し、RSV、HMPV、HRV、HPIV、HBoV および HCoV 等、多数の svARIs ウイルス株が分離・検出された。各地域あるいは国単位の分子疫学解析成績等から、いくつかの興味ある知見が得られており、特記すべき知見詳細は該当の個別研究報告書を参照されたい。