

# ウイルス性感染症の予防・診断法に関する研究

研究室

特定疾病分野

Research Unit for Emerging and Re-emerging Disease

事業推進  
担当者

今井 邦俊 (Kunitoshi Imai), 小川 晴子 (Haruko Ogawa)

## 研究要旨

2003年以後世界中に発生が拡大している高病原性鳥インフルエンザによって人の死亡例が続出している事は非常に憂慮される。

人から人へ伝播可能な強毒ウイルスに変異すれば制御困難な世界的大流行を招く危険性があり、人獣共通感染症の問題として取り組むべき重要課題である。新型ウイルスの発生時には新たなワクチンが流行最盛期に投与される事が想定されるが、それらのワクチンにはより迅速に強い効果を発揮する事が求められる。本研究では、インフルエンザワクチンの抗原性を増強する為に人と鶏が共通して保有する自然抗体を活用する新たな方法を確立すべく研究を行なっている。一方、銅イオンにインフルエンザウイルスを不活化する効果がある事を見出し、その作用機序と安全性を明らかにすべく研究を行なっている。医療現場や畜産現場に広く応用可能な製材の開発はインフルエンザ感染の制御に大きく貢献する可能性があると考えられる。また、発生時の迅速な診断は、蔓延防止に非常に重要であるために簡便・迅速な新しい診断法の開発を行う。インフルエンザに限らず家畜及び家禽における感染症は「食の安全」に直結する重要な問題であり、その予防と制御への取り組みは近年益々求められている。様々な病原体に接触する機会を持つ家畜にとって自然免疫能を高める事は健康維持に極めて意義を持つと考えられる為、家畜において自然免疫賦活化効果を発揮する可能性のある物質について研究を進めている。

## 自然抗体を活用したインフルエンザワクチンの抗原性の増強

**【目的】** 本研究は人と鳥類が共通して保有する  $\alpha$ -ガラクトース抗原 (Gal) に対する自然抗体 (抗 Gal) を活用してインフルエンザワクチンの抗原性を増強し人と鶏のワクチンに応用する事を目的とする。同様の目的でこれまで行なわれて来た Gal をアジュバントとして利用するガンワクチンの研究を進展させてインフルエンザワクチンに応用しようとするものである。

**【結果】** インフルエンザウイルスに糖転移酵素を用いて酵素学的に Gal を発現させた不活化ワクチンを作製し、鶏に投与してワクチン効果を評価した。Gal を発現させたワクチンは同抗原を発現しないワクチンと比較して、より早期により高い抗インフルエンザ抗体の上昇を誘導する可能性を示唆する結果が得られた (図1)。現在追加実験を実施中である。Gal を発現する細胞においてインフルエンザウイルスを増殖させる事により Gal を発現するウイルスを容易に得る事ができると考えられる。鶏繊維芽細胞に Gal の生成酵素である  $\alpha$ -1,3galactosyltransferase (GT) の遺伝子を導入し、同細胞が Gal を発現する事を確認した。Gal 定常発現鶏繊維芽細胞を用いて Gal 発現インフルエンザワクチンを

作製しそのワクチン効果を検討すべく実験を進めている。

**【考察】** 私達はガンワクチンにいわゆるアジュバントとして Gal を発現させる事により抗 Gal を保有する動物においてガンワクチンの抗原性を増強できる事を報告してきたが、同様の方法でインフルエンザワクチンの抗原性も増強できる可能性を示唆する結果が得られた。新たなワクチン製造法も検討されているが、現在のところは大量のインフルエンザワクチンの製造には鶏卵が用いられている。遺伝子導入により Gal を発現する鶏を作出できればその鶏卵を用いて Gal を発現したインフルエンザワクチンの大量生成が可能となると考えられる。鶏始原生殖細胞を用いた遺伝子改変鶏の作出を目指している農業・食品産業技術総合研究機構の田上とともに Gal を発現する遺伝子改変鶏の作出を目指して共同研究を開始している。

## 銅ゼオライト含有布のインフルエンザウイルス不活化効果

**【目的】** 銅に抗菌作用がある事は古くから知られてきたが、私達は吸着効果を有する結晶性鉱物であるゼオライトを担体として銅イオンを吸着させた布 (銅ゼオライト布) にインフルエンザウイルスを不活化する効果がある事を見出した。ウイルス不活化様式及びその作用機序を明らかにする目的で研究を行っている。

**【結果】** 銅ゼオライト布を浸漬した水に弱毒型鳥インフルエンザウイルス (H9N2) を添加し MDCK 細胞におけるウイルスの増殖性を調べると、浸漬した銅ゼオライト布の量依存的にウイルスは不活化され細胞への感染性が失われる事が明らかとなった。キレート効果を有する EDTA の添加により銅ゼオライト布によるウイルス不活化効果が消失する事、またゼオライトのみを含有する布にはそのような効果が認められない事から、不活化効果は銅イオンによって引き起こされていると考えられた。ウイルス粒子の形態への影響を電子顕微鏡で調べたところ、ウイルス粒子の著しい膨化や変形が認められた。また、銅ゼオライト布により処理されたウイルスタンパクを電気泳動で解析すると正常ウイルスには存在しない大きさのタンパクが検出され、ウイルス不活化効果と関連する可能性が考えられた。感染性を失ったウイルスが、細胞への接着・侵入・複製のいずれの過程において障害されているのかを知る目的で現在実験を行なっている。インフルエンザウイルスの Nucleoprotein (NP) に対するモノクローナル抗体を用いた細胞内染色により、銅ゼオライト布により処理されたウイルスは細胞内での増殖が著しく損なわれている事が確認できた (図2)。家禽の飲水中や鶏舎のフィルターへの応用が期待できる事から、同布を浸漬した水を長期間マウスに摂取させて安全性を確認している。また、不活化効果は高病原性鳥インフルエンザウイルスに対しても認められた。

**【考察】** 銅ゼオライト布がインフルエンザウイルス不活化効果を有しかつ安全な物質であれば、畜産分野での広い応用が期待できると考えられる。インフルエンザウイルスに対する効果の作用機序を明らかにするとともに、他のウイルスに対する効果も比較検討していく予定である。

## 迅速・簡便な新しい鳥インフルエンザウイルス抗体検出法の開発

**【目的】** 鳥インフルエンザウイルス (AIV) の抗体検査には、OIEにより推奨されている寒天ゲル内沈降テスト (AGPT) が世界的に広く使われている。本法は、AIVの亜型に関係なく抗体を検出できることから、野外家禽群のモニタリングに適しているため我が国でも用いられている。しかし、感度が低いことと、判定までに少なくとも48時間以上要すること、および多数検体を調べるためには、多量の陽性抗原と陽性血清を必要とするためにこれらの作製に多くの時間と労力がかかる欠点がある。このため、迅速でより感度が高い簡

便な抗体検出法の開発が求められている。今回、組換え蛋白を用いた AIV 抗体検出法の開発を行った。

**【結果】** 大腸菌を用いて発現させた A/chicken/Yokohama/aq/55/01(H9N2) の Nucleoprotein (NP) の組換え蛋白を精製後、NP をラテックスビーズのカルボキシル基に結合させた (NP-LA)。NP-LA を用いて抗体検出用ラテックス凝集抑制テスト (NP-LAT) を開発し、その有用性を検討した。

5  $\mu$ l の NP-LA と等量と血清を 5 分間混合し、時間内に明瞭な凝集を示した検体を抗体陽性と判定した。血清は鶏肝臓パウダーによる吸収後実験に供した。その結果、SPF 鶏 (149 検体) では、非特異的反応は認められなかった。NP-LAT は、各種亜型抗体を検出できた。また、AIV 感染後 15 週まで鶏血清を継続的に調べたところ、NP-LAT は AGPT より長期間抗体を検出できた。

**【考察】** 今回開発した NP-LAT は、AGPT に比べて感度が高く、迅速であることが明らかとなったが、今後は他の鳥類の血清や多数の野外血清を用いてその有用性を検討する必要がある。

## 発表論文

著者名	論文タイトル	掲載雑誌	巻	ページ	発行年
K. Imai, K. Nakamura, M. Mase, K. Tsukamoto, T. Imada, and S. Yamaguchi	Partial protection against challenge with the highly pathogenic H5N1 influenza virus isolated in Japan in chickens infected with the H9N2 influenza virus	Archives of Virology		印刷中	
Nakamura K, Waseda K, Yamamoto Y, Yamada M, Nakazawa M, Hata E, Terazaki T, Erya, A, Imada T, Imai K.	Pathology of cutaneous fowlpox with amyloidosis in layer hens inoculated with fowlpox vaccine.	Avian Diseases	50	152-156	2006
Tanimura N, Tsukamoto K, Okamoto M, Mase M, Imada T, Nakamura K, Kubo M, Yamaguchi S, Irishio W, Hayashi M, Nakai T, Yamauchi A, Nishimura M, Imai	Pathology of fatal highly pathogenic H5N1 Avian influenza virus infection in large-billed crows ( <i>Corvus macrorhynchos</i> ) during the 2004 outbreak in Japan.	Veterinary Pathology	43	500-509	2006
Mase Masaji, Eto Mariko, Tanimura Nobuhiko, Imai Kunitoshi, Tsukamoto Kenji, Horimoto Taisuke, Kawaoka Yoshihiro, Yamaguchi Shigeo	Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China.	Virology	339	101-109	2005
Imai Kunitoshi, Ishihara Ryoko, Nishimori Tomoko.	First Demonstration of Bovine Herpesvirus 2 Infection among Cattle by Neutralization Test in Japan.	Journal of Veterinary Medical Science	67	317-320	2005

Anti-H9N2 IgM titers in chickens after the 1st immunization with Gal-H9N2 or H9N2

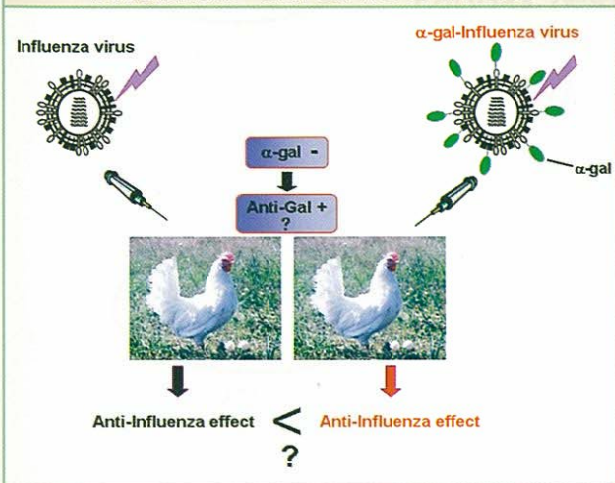


図1: Galを発現させたワクチン(Gal-H9N2)は同抗原を発現しないワクチン(H9N2)に比較しより早期により高い抗インフルエンザ抗体の上昇を誘導する?

NP-LATによる鳥インフルエンザウイルス抗体の検出

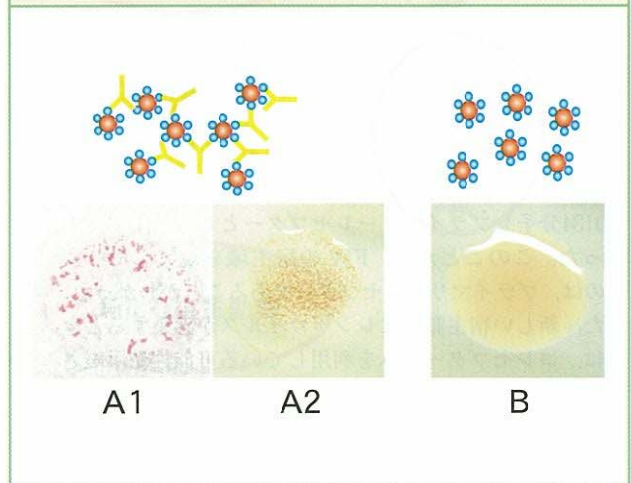


図2: A1: 抗体陽性 (強凝集像); A2: 抗体陽性 (凝集像); B: 抗体陰性 (未凝集像)