

200/0703

厚生労働省

平成13年度

厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

総括・分担研究報告書

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

平成14(2002)年3月

主任研究者 田代真人

(国立感染症研究所ウイルス製剤部)

# 新型インフルエンザ対策に関する総合研究

平成13年度 研究組織

主任研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 部長

分担研究者 喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科・家畜衛生学教室 教授  
河岡義裕 東京大学医科学研究所 分子ウイルス学 教授  
本郷誠治 山形大学医学部 細菌学教室 助教授  
小田切孝人 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長  
鈴木 宏 新潟大学医学部 公衆衛生学教室 教授  
榎並正芳 金沢大学医学部 生化学第一講座 助教授  
菅谷憲夫 日本鋼管病院 小児科 部長  
奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課 課長

## 目 次

平成13年度

### I. 総括研究報告書

新型インフルエンザ対策に関する総合研究

主任研究者：田代真人 \_\_\_\_\_ P. 1

### II. 分担研究報告書

1. シベリアおよびアジアにおける鳥インフルエンザの疫学調査

喜田宏：共同研究者 岡崎克則、迫田義博 \_\_\_\_\_ P.10

2. 香港 H5N1 インフルエンザウイルスの病原性発現の分子基盤

河岡義裕 \_\_\_\_\_ P.12

3. インフルエンザウイルスの増殖における M2 蛋白質の役割

河岡義裕 \_\_\_\_\_ P.14

4. アジア型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン蛋白の抗原構造に関する研究

本郷誠治 \_\_\_\_\_ P.16

5. 新型インフルエンザ対策に関する総合研究

小田切孝人：共同研究者 西藤岳彦、板村繁之、斉藤利憲、渡辺真治、今井正樹、  
進藤奈邦子、多屋馨子、山下和予、岡部信彦、真瀬昌司、真田直子  
(財)細菌製剤協会、全国都道府県制令指定都市衛生研究所 \_\_\_\_\_ P.20

6. アマンタジン耐性インフルエンザウイルスの分子疫学的研究

鈴木宏：共同研究者 斎藤玲子、押谷仁、坂井貴胤 \_\_\_\_\_ P.25

7. 遺伝子組換えによるインフルエンザウイルスの弱毒化とワクチン株の開発に関する研究

榎並正芳 \_\_\_\_\_ P.28

8. インフルエンザウイルス感染症の迅速診断、QuickVue Influenza Test の検討

菅谷憲夫 \_\_\_\_\_ P.30

9. H9 亜型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体の作製

奥野良信：共同研究者 中川直子 \_\_\_\_\_ P.34

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P.37

IV. 研究成果の刊行物・別刷（別添え）

## 新型インフルエンザ対策に関する総合研究

主任研究者 田代真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長

近く新型インフルエンザの出現が想定されているが、その際には地球全体で未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧される。厚生労働省では、平成9年の新型インフルエンザ対策検討会報告書および平成11年のインフルエンザ特定感染症対策要綱に沿って、新型インフルエンザ対策の策定・実施を進めている。この間に、香港におけるトリH5N1型やH9N2型ウイルスの流行が繰り返され、またWHOから新型インフルエンザ対策指針及び大流行間期におけるワクチン接種勧告が出された。そこで、これらを考慮して、従来の方針の見直しと、その実施要領の策定を昨年度に引き続いて進め、その計画を実現するための基礎研究と政策策定の議論に必要な調査研究を進めた。その結果、新型インフルエンザ対策の基本方針に大きな変更の必要は無いが、抗インフルエンザ薬の実用化に伴ってその備蓄と供給計画が新たな対策課題であること、本年からWHOが世界のインフルエンザ対策全般に積極的な方針を決定したことに対応した各国の対策を見直すこと、また、これらの実施のための具体的な行動計画を早急に作成する必要がある。またその計画を実現するために必要な基礎研究を推進させるとが緊急課題である。また、新型インフルエンザ対策は毎年のインフルエンザ対策の積み重ねの上に成り立つとの認識から、本年度においては予防接種法の一部改正が行われて、我が国においても高齢者を中心とした新たなワクチン接種体制が実現した。一方、熱帯・亜熱帯地域の途上国においてはインフルエンザに対する関心・認識が不十分であり、今後この地域における実態の解明と啓発活動が重要課題である。

### 分担研究者

喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科教授  
河岡 義裕 東京大学医科学研究所ウイルス研究  
部門教授  
本郷 誠治 山形大学医学部細菌学講座助教授  
小田切孝人 国立感染症研究所呼吸器系ウイルス  
室長  
鈴木 宏 新潟大学医学部公衆衛生学講座教授  
榎並 正芳 金沢大学医学部第1生化学講座助  
教授  
菅谷 憲夫 日本鋼管病院小児科部長  
奥野 良信 大阪府公衆衛生研究所ウイルス課長

### 研究協力者

永田 恭介 東京工業大学生命工学部助教授

### A. 研究目的

A型インフルエンザでは、数10年に一度の割合で新（亜）型ウイルスがヒトの世界に出現して世界的な大流行を起こす。既にA/H3香港型の出現か

ら33年、A/H1ソ連型の出現から25年が経過し、流行ウイルスの抗原変異の程度や流行規模が小さくなっている等の様々な状況証拠から、近く新型インフルエンザの出現が想定されている。近年における人口増加や人口集中、交通の発達など地球全体の生活環境の大きな変化によって、新型インフルエンザは短期間に集中して大流行が拡がり、未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧されている。

旧厚生省では、新型インフルエンザ対策のために、平成9年に新型インフルエンザ対策検討会を組織して対策の基本方針を定めた。さらに、感染症新法の施行に応じて、インフルエンザを重要な感染症としてインフルエンザ特定感染症基本指針を定め、その後、引き続いて厚生労働省ではその対策を進めている。一方、諸外国でも新型インフルエンザによる大流行対策を整備しつつあり、WHOでも地球レベルでの新型インフルエンザ対策の確立に本格的に取り組み始めた。

本研究では、これらの経緯を踏まえ、更に香港におけるトリH5N1型およびH9N2型インフルエンザの流行、WHOの新型インフルエンザ対策要綱や大流行間期におけるワクチン接種勧告、抗インフルエンザ薬や迅速診断キットの実用化などの状況の変化を考慮して、1)わが国の新型インフルエンザ対策基本方針の見直し、2)新型ウイルス出現予想方法・早期検知方法の確立、3)新型インフルエンザ大流行の規模、健康被害、社会的影響の予測とシナリオの作成および事前準備計画の策定、4)ワクチン緊急開発・増産・接種体制や抗インフルエンザ薬の備蓄、供給体制の整備など、新型インフルエンザ出現時に各シナリオ状況下での被害を最小限に留めるための行動計画の策定、5)事前準備計画および行動計画を実施するための諸条件の検討、6)国際協力体制の検討等、新型インフルエンザ対策のための議論に必要な科学的根拠を与える調査研究及び基礎研究を行い、総合的インフルエンザ危機管理体制の確立に資することを目的として、昨年度に引き続いて研究を進めた。

## B. 研究方法

本研究は3年計画であるが、2年目の本年は、作年度に引き続き、研究目的項目の検討・議論に必要な資料を収集・作成することを共通課題として、各分担研究者においてその準備のための調査を進めた。特に、平成9年の香港におけるトリH5N1型インフルエンザ出現の際の対応についての評価、反省に基づく多くの教訓から、現在及び今後の問題点を列挙するとともに、現在までの新型インフルエンザ対策の見直し作業を進めた。また、臨床現場やサーベイランス現場における迅速診断キットの普及によるウイルス分離効率の向上と、アマンタジンやノイラミニダーゼ阻害剤の実用化・普及により新たな問題点も指摘されており、これらの問題点の把握と解決に向けた取り組みも行った。

一方、各項目に対する準備計画・対応計画の実現を図るために、新型インフルエンザ出現機構の解明、予測・早期検出方法の開発、ワクチン緊急開発技術の確立、安全性と品質を確保した上でのワクチン緊急増産体制の確立、抗インフルエンザ薬の意義と限界およびその使用ガイドラインの検討、新規の新型インフルエンザ治療・予防法の開発等に関してそれぞれの分担項目についての基礎研究を進めた。

さらに、WHOを始め諸外国における新型インフルエンザ対策の計画、進捗状況、問題点を把握し、我が国の新型インフルエンザ対策の再検討に活用す

るとともに、インフルエンザ問題に対する国際協力を推進する方策を検討した。

また、緊急に対応が必要であり、現在その実施が可能と考えられる準備計画・対応計画については、その具体的な実施方法を順次検討した。

さらに、平成13年11月の予防接種法改正に対応するインフルエンザワクチン接種要領やガイドライン等の検討、予防接種法一部改正に関する国会（衆議院）における質疑・修正議論に対応した政策の科学的裏付けの検討等を行った。

## C. 研究結果

1)わが国の新型インフルエンザ対策基本方針の再検討

### a. 基本方針の再検討

平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会の報告書は、新型インフルエンザに対する事前準備と行動計画の骨子を示している。また、新型インフルエンザ対策は、流行間期の通常のインフルエンザ対策の延長線上にあるとの認識を示し、毎年のインフルエンザ対策の確立を求めている。

その後WHOにおいても新型インフルエンザ対策要綱が提出され、地球レベルでの新型インフルエンザ対策が進められている。更に平成12年6月に東京で開催されたWHOインフルエンザ会議において、流行間期のインフルエンザの健康被害の総計は、数十年に1回おこる大流行の被害に匹敵するとの見地から、流行間期のインフルエンザ対策の充実が勧告された。

この間に、香港においてトリ強毒H5N1型、続いてH9N2型ウイルスが直接ヒトに感染して、健康被害をもたらすという予想外の事態が生じた。そこでまず、この際の教訓と対応についての評価を行った。その結果、まず第1に、トリのウイルスが直接ヒトに感染したこと、また従来インフルエンザと言う呼吸器疾患の概念を超える強毒株ウイルスによる感染が起こったことから、これまでのインフルエンザに対する考え方を大幅に修正する必要がある。

### b. 動物インフルエンザに対するサーベイランス体制の再検討

H5N1型の起源については、遺伝子解析の結果、H9N2、H5N1、H6N1型のトリウイルスが、カモ、ウズラなどのトリを宿主して、20年以上前から東アジアを中心に拡がっており、これらのウイルス遺伝子が複雑に交雑した再集合体として、香港H5N1が出現したことが想定された。さらに、香

港で流行したウイルスには、系統を異にする2種類のH5N1が同時に流行していたことが示され、偶然とはいえ、従来の予想を超えるものであった。今後どのようなウイルスが新型として出現する可能性があるかを考えるためには、従来の概念よりも更に広くトリ、ブタにおけるインフルエンザウイルスの生態を解明し、その動向を監視する必要がある。このための基礎研究、野外研究を緊急に進める必要がある。

当研究班でもシベリア、モンゴルおよび北海道などアジア各地におけるトリのインフルエンザの疫学調査を行い、多くのカモから74株のウイルスを分離した。これらについて米国、香港などと協力して遺伝学的・系統学的な解析を行った結果、これらはアメリカやヨーロッパのトリウイルスとは系統を異にするユーラシア系統のウイルスであり、さらに以前ヒトで流行したA/H2アジア型ウイルスとは異なる系統のH2型亜群の分布も明らかになった。

また、動物とヒトとの間の宿主域を決める障壁の実態、動物からヒトへのウイルスの馴化機構等についても、従来の学説では説明し得ない現象が起こっていた。HA蛋白に対するレセプターの特異性のみでは、トリのウイルスがなぜヒトに感染できたのか、またヒトからヒトへの伝播性を獲得する条件に関して十分には説明し得ないことが示された。宿主域を決定するその他の宿主因子についても、現時点では十分な知見が得られておらず、そのためにサーベイランスの結果分離されたウイルスの解析結果についての解釈・評価が不十分である。今後の新型インフルエンザ対策の方向性を決める上で、これらに関する基礎研究も緊急課題である。

以上の検討から、トリインフルエンザウイルスに対するサーベイランスと早期発見のための診断体制の確立、および15亜型すべてに対するワクチンの事前開発・緊急増産体制の確立が必要であることが結論された。そのために、平成10年度からトリ及びブタインフルエンザウイルスの系統保存事業を開始しているが、これらを用いた診断体制の確立とワクチンの開発、更にその安全性と有効性を検証するために、前臨床試験およびヒトにおける臨床試験が必要である。既に本年度までに15亜型の全てについては代表的なウイルスの収集を終えて、各ウイルスに対する抗血清を作製してあり、現在これらを活用した診断キットの開発を進めている。一方、現在、新型インフルエンザとしての可能性の高いH5、H9、H6、H2の各亜型について、その性状解析を進め、緊急用のワクチン製造に向けたワクチン製造

株の開発を進めている。

### c. ワクチン政策の再検討

1997年に香港で流行したH5N1型ウイルスについては、WHOの要請に応じて国立感染症研究所では世界に先駆けてウイルスの弱毒化に成功した。しかし、トリ由来のウイルスを用いたワクチンの有効性及び安全性に関しては、全く経験が無かったために、その後のワクチン試験製造及びその実用化には多くの検討を要することとなり、実際に接種の必要性が生じた際には対応できないことが明らかになった。そこで、現行の製造方法に則って作製したH5N1型ワクチンについて、前臨床試験および臨床第1相試験を行った。その結果、ヒトに対して安全性には問題が無いものの、現行のHAワクチン（エーテルで部分分解したもの）の2回接種では、HI抗体も中和抗体も十分に誘導できないことが示された。

これは、動物実験においては良好な結果を得られても、ヒトにおいては必ずしも適用出来ないことを示している。同様の成績は、英国、米国においても得られており、トリインフルエンザすなわち新型インフルエンザに対するワクチン開発が容易ではないことを暗示している。トリのウイルスがなぜヒトに免疫原性を示さないのか、どこをどのように改変すれば免疫原性を持つようになるのかという基本問題の解明が緊急課題である。脂質を含む粒子構造を持つことが、免疫記憶を持たない多くのヒトに対して、ワクチン接種をするさいの条件であり、新型インフルエンザワクチンにおいて必要な要件であることが強く示唆され、今後の新型ワクチン開発の方向性が明らかになった。HAワクチンではなく、全粒子ワクチンを用いれば、有効な免疫を賦与しうる可能性の追求に加えて、免疫賦活剤としてのアジュバントの併用等の検討も必要である。

この結論を受けて、本年度は、先にリパースジェネティクス遺伝子操作技術により弱毒化したウイルス株を用いて、全粒子型の不活化ワクチンをGMP基準の下で試験製造した。このワクチン製剤は現行のHAワクチンが実用化される以前に、我が国でも使用されていたワクチンであり、現行の生物学的製剤基準にも合致しており、ヒトにも使用可能である。しかし、今回試験製造した全粒子型不活化H5N1型ワクチンについて、ヒトにおける安全性と有効性を検証するためには、動物を用いた前臨床試験が必要であると判断されたため、本年度はそれを実施した。その詳細については、医薬安全研究費補助金の報告書を参照されたい。

新型インフルエンザに対するワクチンの緊急開発と緊急増産は依然大きな課題である。緊急開発については、H5N1型ウイルスの弱毒化に成功したことにより、分担研究者である榎並博士の開発したりバース・ジェネティクスを駆使した方法の有用性が示された。しかし、これに用いた技術は第1世代の方法であり、その応用範囲には制約がある。その後、更にこの方法に改良を加えて、同じく河岡博士らは任意のインフルエンザウイルスを作製しうる最新のリバース・ジェネティクス技術の開発に成功した。今後、これらの方法を更に簡易に行えるように改良し、どのような新型ウイルスが出現しても対応できるようにすることが期待される。これは、世界に対する日本の大きな貢献であると評価できる。

#### d. 抗インフルエンザ薬の評価

一方、平成11年から抗インフルエンザ薬としてのアマンタジンが、更に翌年にはノイラミニダーゼ阻害剤が2種類実用化されて、発売承認を受けた。これらの薬剤の効果には限界があり、決してワクチンに代わるものではない。しかし、新型インフルエンザウイルス出現の際には、ワクチンの大量製造は緊急には間に合わず、また地球上のすべての人にワクチンを供給出来る見通しはない。そこで、新型インフルエンザ対策として、これらの抗インフルエンザ薬の備蓄が有力な手段になりうるものとWHOでも評価している。わが国においても、新型インフルエンザ対策の柱の1つとして、緊急に検討すべき課題であるので、製造・供給量と備蓄の可能性および価格等について各製薬会社と個別に検討を行った。その結果、備蓄における製剤の安定性と備蓄可能期間については製剤毎に大きな差があり、個別に対応する必要がある。また、吸入剤と経口剤では、小児や高齢者への投与における負担に違いもある。製造メーカーにとっても、世界の全人口60億人分の製造と備蓄には能力の限界もあり、今後の解決課題である。またその際の費用負担、備蓄設備、緊急時の供給体制、期限切れ製品の処分方法、耐性ウイルスのモニター耐性等の問題についても、メーカーの負担には限界があるので、国レベル・世界レベルで幅広く検討しておく必要がある。

## 2) 新型ウイルス出現予想方法・早期検知方法の確立

### a. 中国および諸外国におけるサーベイランス

新型ウイルスの出現予想は現時点では不可能である。中国・北京インフルエンザセンター、香港大学

等との共同研究によって、中国南部を中心とした動物インフルエンザウイルスの流行状況を調査した結果、香港で流行したH5N1型ウイルスの起源は複雑な遺伝子再集合の結果もたらされたものであり、その遺伝子供与ウイルスは、中国及び東アジアのトリの間で広く維持されていることが示されている。さらに、その後トリのH9N2型ウイルスがヒトに感染する事態が生じた。また、本年度には香港のトリの間で新たなH5N1型ウイルスの流行が数回にわたってあり、多数のニワトリが斃死したため、香港当局は1997年の教訓に則って、全ての該当するニワトリを殺処分して、感染の拡大と蔓延を防止した。このように、新型インフルエンザ出現の「ニアミス」は予想以上の頻度で起こっていることが明らかにされた。

香港における今後の新型ウイルスの候補としては、H5N1型、H9N2型、H6N1型などが考えられ、特にこれらに対する動向調査と、診断キットの開発、ワクチン株の準備が必要である。これらについては、我が国でも必要なキットを開発して、中国側に提供することを進めている。

中国については、2000年から5年計画で、WHO西太平洋地域事務局が中心となり、厚生労働省・国立感染症研究所と米国CDCが資金を出し合って、中国のインフルエンザサーベイランス体制の確立を進めている。感染研とCDCの技術支援によって、現在までに約半数の省においてインフルエンザセンターが活動を開始しており、分離されたウイルス株は年に4回に分けて感染研とCDCに送付され、詳細な抗原解析と遺伝子解析が行われる体制が確立した。これらの結果は、中国側に還元されるとともに、WHOの流行予測とそれに基づくワクチン株の選定に活用されている。今後中国では、インフルエンザワクチンの接種と国内製造を進める計画であり、これらと相俟って、5カ年計画で進行中の中国におけるインフルエンザサーベイランス体制がより充実することが期待される。

一方、インフルエンザは南北両半球の冬季に流行を起こすが、過去の新型インフルエンザの出現と流行には季節性は無かった。また、新型ウイルスの震源地は中国南部と考えられているが、その他の地域における実態は不明であり、中国以外が震源地となる可能性は否定できない。さらに、熱帯地域では1年を通じて継続的に、亜熱帯地域では雨期を中心として年に2回のインフルエンザの流行が示唆されており、年間の患者数と健康被害は、南北各半球のそれに匹敵するとの推定もなされている。そこで、こ

れまで注目を浴びてこなかった熱帯・亜熱帯地域におけるインフルエンザの実態解明と対策の確立が、新型インフルエンザに対するサーベイランス上からも重要である。

平成13年9月に東京においてWHO・WPROと国立感染症研究所が主催して、東アジア地区のインフルエンザサーベイランスに関するワークショップを開催した。その席でも、途上国においてはインフルエンザの実態は把握されておらず、マラリア等と誤診されている症例も多く、インフルエンザによる健康被害がほとんど認識されていない実態が明らかにされた。今後新型インフルエンザに対する国際協力体制を構築する際にも、まず実態の把握とその正確な評価が重要課題である。

#### b. 我が国における新型コロナウイルス早期検知体制の検討

香港以外でも、同様に動物由来のウイルスがヒトの世界に侵入する可能性は当然存在する。我が国においても、カモなどの渡り鳥によって多くのインフルエンザが持ち込まれているが、これらに対するサーベイランス体制の問題は、厚生労働省と農水省との隙間にある。本年度には両省の担当責任者および研究者による情報交換の機会が何回か持たれたが、農水省側としては、人獣共通感染症としてのインフルエンザの重要性は認識しつつも、あるまでも産業動物であるニワトリとブタに重点があって、ヒトの疾患の対策のためにはなかなか腰が重く、この1年間にも大きな進展はなかった。今後、粘り強く共通の認識と解決を目指す必要がある。しかし、香港で分離されたトリウイルスの輸入手続きに関しては、連絡が密になって迅速な対応が可能となった。これは、新型対策にとって重要な一歩と評価できる。

一方、ヒトの世界への新型コロナウイルス侵入についての早期発見、早期検知方法に関しては、ヒトにおけるサーベイランスをきめ細かく進めることに尽きるが、感染症新法によるインフルエンザサーベイランス事業により毎年1万株近くのウイルスが分離され、その抗原解析が迅速になされている現在の体制は、世界的にも高い水準にあると判断される。

地方衛生研究所から感染症研究所へのウイルス分離報告は、従来は週に1回のファックスによる報告であった。これは、大量の報告を検索するのにも能力が悪く、さらに必要なウイルスの分与が迅速に出来ないために、新型ウイルス出現の際には、後手に回る危険性が指摘された。そこで、現行のWISH・Netを利用したコンピューター・ソフトを緊急に

開発した。これによって、瞬時に新型コロナウイルスの可能性を持つ分離株を検出し、その送付依頼と詳細な解析が迅速に行える体制が整った。現在この試用を済ませ、実用化を進めている。

#### c. 地球インフルエンザ検査センター構想

一方、新型インフルエンザの早期検知には、世界各地におけるウイルスサーベイランス体制の確立と、その情報の共有体制が必要である。WHOでも世界120カ国に約200カ所の国内インフルエンザセンターを設け、世界4カ所（アトランタ、ロンドン、メルボルン、東京）のインフルエンザ協力センターがそれを統括している。しかし、途上国を中心として、このようなサーベイランス体制は十分には機能しておらず、新型インフルエンザの早期検知体制の確立は未だ進んでいない。また、世界各地で同じような検査を平行して行うのは効率が悪く、また費用や人材が不足することから、その確立は困難が予想される。

そこで、米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校では、ビル・ゲイツ財団の莫大な資金援助の下に、同大学内に世界インフルエンザ検査室を設置し、ウイルス分離、抗原解析、遺伝子解析等を24時間以内で行える自動解析装置を5年以内に開発する計画を立てた。WHOに対しては、現在のWHOインフルエンザサーベイランス・ネットワークをこれに協力するように提案があった。それによると、この検査施設に世界中の全てのウイルス分離用の検体を航空便で輸送し、2日以内に解析を終えてそのデータを米国ロス・アラモス研究所に保存するというものである。これが実現すれば、確かにウイルス分離の効率は上がり、途上国における設備・人材・運営に関わる負担は軽減し、新型インフルエンザの早期検知には役立つであろう。しかし、様々な問題点があり、現時点ではこの構想を実現するのは現実的ではないと考えられる。その理由として、(1)サーベイランスの原点である定点観測機関の地理的分布、質的な均一性が解決されていない、(2)患者からの検体採取方法や輸送方法にも未だ統一性が無い、(3)呼吸器からの検体採取はインフルエンザのみを対象としておらず、他の病原体の診断も必要であること、(4)WHOが進めてきた各インフルエンザセンターの技術向上と各国のインフルエンザ対策の拡充に対して水を差すことになる、(5)1カ所のみでの解析結果では誤りがある可能性、(6)インフルエンザ情報が米国1カ所のみ集中することの危険性および科学的進歩に対するブレーキとなる可



能性などが指摘される。

以上から、現在の地球インフルエンザ検査センター構想については、自動解析装置の開発を進めるとともに、これを世界数カ所（現在のWHOインフルエンザ協力センター程度）に配備し、現在の世界インフルエンザサーベイランス・ネットワークをより国立的に運用することが現実的であろう。

### 3) 事前準備計画の策定と実施

#### a. トリインフルエンザウイルス系統保存事業

平成10年度から始まったトリ及びブタインフルエンザウイルスの系統保存事業では、北海道大学喜田教授の全面的な協力の下に現在までに分離されている15亜型すべての代表的ウイルス株の収集を終わっている。更に、それ以外のウイルスの分離・検出を目的として、地方衛生研究所の協力の下に、野生のカモ及びブタからインフルエンザウイルスの分離を進めた。

さらに収集したウイルス株の抗原性状、遺伝子解析を進めるとともに、発育鶏卵での増殖性などワクチン製造株としての適格性を検討し、幾株かの候補ウイルスを見出した。しかし上記の通り、H5N1型HAワクチンは、ヒトに対して十分な抗体を誘導できないことが示されたので、これらのトリウイルスをそのままワクチン製造に使用することは不相当である可能性がある。従って、今後は、ヒトに免疫原性を持たせるための改変を、リバーシ・ジェネティクス技術を駆使して検討する必要あり、この作業を進めている。また、ワクチン製造株の事前開発および緊急開発方法については、リバーシ・ジェネティクスを用いた任意のウイルス製造方法が応用できる可能性が高まった。

一方、これらのトリウイルスの不活化抗原と抗血清を製造した。これを基にして15亜型の同定キットを作製した。2年前から導入されたA型インフルエンザウイルス迅速診断キットと併用することにより、新型ウイルスが分離された際の迅速診断体制が整いつつある。

#### b. ワクチン緊急増産体制

ワクチンの緊急増産については、現行不活化ワクチンは発育鶏卵を用いているので、発育鶏卵の供給体制が鍵となる。今後、高齢者に対するワクチン接種が広く普及すれば、毎年2000万人分以上のワクチンを製造することになる。新型インフルエンザには単味ワクチンを使用することになるが、2回の接種が必要となるので、単純計算で現行の1.5倍

である3000万人分位の製造量が確保できよう。これは全国民の25%に相当するが、さらに海外からのワクチン供与の依頼が予想されるので、更に増産を図る必要がある。新型インフルエンザの際に国民全員にワクチン接種を行うためには、1億2000万人分のワクチンが必要であり、そのためには現在の4倍以上の製造が必要とされる。現在の設備では、1週間で1~200万人分程度のワクチンしか製造できず、必要量を満たすには数ヶ月掛かることになる。

この間に、ワクチン接種の優先順位を予め設定しておく必要がある。全員が免疫を持たない事態では、国民全員がワクチン接種の対象者となるが、特に健康被害が予想される群、または社会機能の維持に不可欠な職種等をどのように設定するかは、大きな問題であり、広く国民の意見を聞いて同意を得ておく必要がある

緊急時のワクチン大量製造を確保するためには、製造設備の拡充に加えて、毎年それらの設備を稼働させる必要がある。新型ウイルスを用いてワクチンを製造する際には、従業員が感染を受ける危険性、また感染した従業員から社会へ感染が拡大する危険性、さらに製造所から外部へウイルスが漏出する危険性などのバイオハザードの面からの検討も必要である。これらを考慮して、厚生省では、国内のワクチンメーカーの製造施設を物理的封じ込め可能な構造に改善するように勧告し、その工事を進め、本年度に終了した。その結果、5カ所においてその設備が完成し、本年度全般にはGMPの査察が行われて、全てほぼ満足の行く結果が報告された。製剤の品質管理上のGMPに準拠しながら、環境への汚染を防ぐという二律背反の条件ではあるが、順調に進行していると評価できる。

ワクチンの緊急増産体制を維持するためには、例年における国内のワクチン接種率を更に向上させるとともに、ワクチンの海外への供与、輸出も積極的に考慮すべきである。この政策には、カナダ政府が検討している方式が参考になる。すなわち、全国民人口の110%のワクチンを毎年国内で製造し、ワクチン接種率を100%まで高める。一方、余剰分はワクチンを製造していない国に輸出するというものである。例年のインフルエンザに関しては、ワクチンの輸入も許容されようが、新型インフルエンザの際にはワクチンの緊急輸入は事実上不可能であるので、ワクチンの自給体制の確保は健康政策における安全保障上からも不可欠であると考えられる。

発育鶏卵の供給には限界があるので、組織培養細

胞を用いたワクチンの開発は緊急課題である。これに関しては、国内外の研究者、ワクチンメーカーが既に候補となるものの開発に成功しており、今後は安全性、有効性の検証とともに、大量生産と安定供給体制の検討が必要である。

### c. 抗インフルエンザ薬

我が国でも3年前からアマンタジンやノイラミニダーゼ阻害剤の販売が認可され、健康保険の適応にもなっている。WHOの新型インフルエンザ対策として、これらの抗インフルエンザ薬の備蓄が有力な手段になりうることを示唆された。わが国においても、新型インフルエンザ対策の柱の1つとして検討すべきであるが、その費用負担、備蓄設備、緊急時の供給体制等の問題を解決する必要がある。

更に、これらの抗インフルエンザ薬に使用に関しては、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。もしも新型ウイルスが耐性を獲得していた場合には、現在の新型インフルエンザ対策は大きく躓くことになる。特にアマンタジンについては、数日の連用により50%にも及ぶ耐性ウイルスが出現し、さらに耐性ウイルスが感染伝播している実状が明らかにされた。さらに、A/H3N2香港型にアマンタジン耐性ウイルスの出現頻度が高いことが示され、またA/H3N2香港型とA/H1N1ソ連型では、M2タンパクのアミノ酸置換部位が異なっていることが明らかにされた。我が国における発売承認以来、年間120万人に投与されていることが推定されたが、使用量の増加は今後耐性ウイルスが選択されて優位となり、新型出現時にはアマンタジンの効果が期待できなくなる事態が危惧される。今後ノイラミニダーゼ阻害剤の普及によりアマンタジンの使用量は減少することが予想されるが、アマンタジンの濫用を規制する必要がある。

一方、ノイラミニダーゼ阻害剤についても、2年前からWHOを中心とした国際的な耐性ウイルスのモニター体制が整備されつつある。初年度には耐性ウイルスのスクリーニング法として様々な方法を比較検討した結果、合成基質を用いた化学蛍光発光法による酵素反応の定量法を用いることが決定された。本年度は、ノイラミニダーゼ阻害剤使用前のバックグラウンドの程度を知る目的で、サーベイランス事業による収集したウイルス株500株について、ノイラミニダーゼ活性および阻害剤の効果を定量し、またNAおよびHA遺伝子の塩基配列も併せて検討した。その結果、現在の流行株の中には耐性のNAを持つウイルスは検出されなかったが、最近のH1

およびH3型ウイルスのHAについては、細胞表面のシアル酸レセプターとの結合性が低下しているものも多く、機能的には薬剤に低感受性のウイルスである可能性がある。今後もしこのような低感受性ウイルスや耐性ウイルスが出現した際には、薬剤の使用制限などを含めて、どのような対応を執るのかを予め検討しておく必要がある。

### 4) 新型ウイルスが出現、侵入、流行した場合、また大流行が起こった場合の行動計画の策定

1999年のWHO新型インフルエンザ対策要綱では、新型インフルエンザウイルスがヒトから分離された場合、ヒトからヒトへの伝播が確認された場合、流行が起こった場合などに分けて、WHOが執るべき行動、各国が執るべき対応などの指針を示している。さらに、この指針に沿って、各国でそれぞれの場合に応じた行動計画を予め建てるように勧告している。わが国の新型インフルエンザ対策検討会報告者では、指針に相当する要領は示されているが、未だ具体的な行動計画案は出来ていない。

今後、本研究班で行動計画案の草稿を作成し、厚生労働省の新型インフルエンザ対策検討会において検討し、国が策定する必要がある。本年度は、具体的な行動計画の個別項目を列挙して検討したが、この項目については予算、担当部局、命令系統、責任体制などの問題を解決しなくてはならず、全体として纏めるまでには至っていない。来年度も引き続き検討する必要がある。その際には、内閣府の危機管理システムとも情報交換を行う必要が指摘された。

### 5) 国際協力体制の再検討

新型インフルエンザによる大流行は全世界を席卷する規模で起こるので、その対策には国際協力が不可欠である。近年における人口増加、交通の発達など地球全体の生活環境の大きな変化によって、短期間に集中して大流行が拡がり、未曾有の健康被害と社会的混乱が生じることが危惧されている。特に、1918年のスペインインフルエンザの大流行に際しては世界中で2~4千万人の死亡が推定されているが、当時に比べて現在の地球上の人口は3倍以上に増加しており、人口密度も3倍以上になっているので、死亡者数は6千万人に上るものと推定される。

また交通の発達と人の移動も飛躍的で、スペインインフルエンザでは流行が約6ヶ月かかって地球を一周したのに対して、現在では4日間で世界中に拡がるのが想定される。そのために、健康被害も短期間に集中的に起こるので、未曾有の社会的混乱が

生じるものと危惧される。

この様な健康危機、社会危機に対応するためには、健康危機管理の面からのみの対応では不可能であり、国家レベル、地球レベルでの危機管理が必要である。

一方、過去の例や、動物ウイルスの動向などから、中国南部が新型インフルエンザ出現のエピ・センターと目されている。従来から中国におけるインフルエンザの動向は一部しか明らかにされておらず、その実態の多くは不明であった。平成9年の香港におけるH5N1型、11年のH9N2型に関しても、中国本土における情報は不透明であった。更に各国が独自に様々な経路で情報の提供を依頼するという事態も重なって、正確な情報が流れずに、不要な混乱をもたらしたことは否めない。平成10年8月に中国南部でH9N2型ウイルスがブタとヒトから分離されたとの非公式報告があった。これについてもその後の情報が途切れていたが、平成12年5月に中国の国内インフルエンザセンターと5カ所の省公衆衛生研究所インフルエンザセンターを査察した結果、ヒトにおけるH9N2インフルエンザの流行があったことを確認した。しかしヒトからの分離ウイルスについては、実験室内の交叉汚染による紛れ込みの可能性も否定できず、実験施設の整備が必要であることが明らかになった。

しかし最近、中国側のインフルエンザに対する認識の変化と、WHOを中心とする地道な努力によって、ようやく中国を対象としたサーベイランス体制が整いつつある。WHOでは今後5年計画で、中国自身でインフルエンザサーベイランスを行えるような国内計画を承認し、資金援助と技術支援を約束した。これに関しては、わが国の大きな貢献も期待されており、国内におけるインフルエンザ対策と平行して、中国をはじめ東アジア諸国との国際協力を促進する必要がある。これまで、多くのチャンネルが錯綜して、かえって円滑な協力関係を阻害する傾向もあり、これらの反省に立って、今後、その具体的な方策を検討する必要がある。

WHOにおける従来のインフルエンザ対策は、主にワクチン製造株の決定を目的としたサーベイランスの充実を目標としており、インフルエンザ対策全体については議論されてこなかった。国際的なサーベイランス体制に参加する以上、自国への還元というメリットが無ければ協力への熱意も起こらず、また資金提供もほとんど無かったことから、ワクチンを製造していない途上国においては、インフルエンザに対する関心は低かった。

平成13年9月にはWHO西太平洋地域事務局と

国立感染研が主催して、WPRO地域を中心とするインフルエンザサーベイランスに関するシンポジウムを開催した。その結果、熱帯・亜熱帯地域においてもインフルエンザによる健康被害は少なからざるものがあること、しかし途上国においてはインフルエンザへの認識・関心と対策に対する優先度は低いことが明らかになった。特に、新型インフルエンザに対しては、全くといってよいほど準備は出来ていない。現時点で、新型インフルエンザの危険性を述べても実感として認識されないのは致し方のないことであり、今後、途上国を対象とした啓発とインフルエンザ対策の確立が、大きな国際的課題の一つである。これらに関しては、WHOとしての活動には制限もあり、また資金調達の面からも自由度が狭いので、幅広い立場を結集してWHOの活動を支援するために、来年度から東アジアを中心としたインフルエンザ対策支援体制（アライアンス）の設立を検討することとなった。

#### D. 考 察

わが国における新型インフルエンザ対策を再検討した。平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会で検討した当時は、わが国のインフルエンザ政策はほとんど崩壊状態にあった。従って、同報告書では、新型インフルエンザ対策は例年の大流行間期の対策の延長上にあり、新型インフルエンザ対策を検討するためには、まず毎年のインフルエンザ対策を確立することが前提であるとの結論を出している。その後、この報告に基づいて、毎年のインフルエンザ対策の再構築が図られ、更に感染症新法に基づいたインフルエンザ特定感染症対策指針によって、サーベイランスおよびワクチン政策の充実が進んでいる。さらに本年度は、国会の事情で審議が遅れていた予防接種法の一部改正が行われた。これは我が国のインフルエンザ政策の大転換であり、今後の方針を明確にしたものと言える。高齢者における意思表示、接種費用の負担などの問題点も指摘されるが、国会の付帯決議により5年後の見直しが必要とされており、このためのワクチンの安全性・有効性に関するデータの整備が求められている。特に基礎疾患を持つ60歳以上の準高齢者については、これらに関する成績は世界的にも極めて少なく、今後の課題である。

例年のインフルエンザ対策にも未解決の部分は多いが、一応の基本方針が定まったといえる。そこで、改めて、新型インフルエンザ対策の実施について検討する時期に來たと言えよう。この間に、WHOで

は新型インフルエンザ対策指針を出し、WHOの役割を規定するとともに、新型インフルエンザに対する事前準備と行動計画を各国で整備するように勧告した。一方、香港におけるH5N1型、H9N2型の出現は、従来の概念を超える事態であり、多くの教訓を残している。

これらの新展開を考慮して、平成9年の厚生省新型インフルエンザ対策検討会の報告書を見直すとともに、事前準備と行動計画の作成が急務である。一方、H5N1インフルエンザにおける多くの教訓から、緊急に進めるべき基礎研究の項目も明らかになってきた。さらに、新型インフルエンザは地球レベルでの健康危機管理、社会危機管理の問題でもあるので、その検討には、人文・社会・経済・法律などの幅広い専門家の参加が不可欠である。さらに、新型インフルエンザ対策の有効な実施には国民の納得と合意が必要であり、そのためにも開かれた議論が必要である。

今後はこれらを平行して、わが国の新型インフルエンザ対策の確立と継続・維持に寄与していきたい。

## E. 結 論

最近のわが国におけるインフルエンザ政策の進展と、香港におけるH5N1型インフルエンザ流行時の教訓に基づいて、新型インフルエンザ対策の再検討を進めた。

この数年間にわが国のインフルエンザ対策は大きな進展があったと評価できる。現時点では、新型インフルエンザ対策検討会報告書の方針を大幅に改定する必要はないが、今後緊急に事前準備と行動計画を具体的に策定する必要がある。また、この計画を実施可能とするための基礎研究が必要である。特に、以前考えられていた範囲を超えて、動物インフルエンザのサーベイランスの必要性、宿主域を超えてヒトの間で流行するための条件の解明、ワクチンの事前準備と安全性・有効性の事前検証、ワクチン緊急増産体制の構築、抗ウイルス剤の備蓄についても、緊急に検討を必要とする。

## F. 研究発表

1. Reickert, T., Sugaya, N., Fedson, D., Glezen, W., Simonen, L., Tashiro, M. Experience in Japan of the vaccination of schoolchildren against influenza. *New Engl. J. Med.* 2001
2. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., Shigeta,

S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Infect. Dis.* 39: 2001

3. Kato, A., Ohnishi, Y., Hohase, M., Saito, S., Tashiro, M., Nagai, Y. The smallest Y2 of Sendai virus C proteins is fully capable of both counteracting the anti-viral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76: 2001

4. Umino, Y., Tashiro, M. Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. *Vaccine* 19: 1369-1372, 2001

5. Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., Tashiro, M. : Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* 146: 2001

6. Saito, T., Lim, W., Suzuki, Y., Kida, H., Nishimura, S.-I., Tashiro, M. : Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine* 20: 125-133, 2001

7. Layne, S. P., Beigelsdijk, T. J., Taubenberger, J. K., Cox, N. J., Gust, I. D., Hay, A. J., Tashiro, M., Lavanchy, D. : Global laboratory against influenza. *Science* 293: 1729, 2001

8. Yamamoto, A., Nakayama, M., Kurosawa, Y., Sugo, K., Karsawa, H., Ogawa, T., Takasaki, T., Tashiro, M., Kurane, I. : Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J. Virol. Methods*

9. Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Tanabayashi, K., Tashiro, M. : Recombinant wild-type and Edmonston strains measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J. Virol.*

10. Kato, A., Onishi, Y., Hishiyama, M., Kohase, M., Saito, S., Tashiro, M., Nagai, Y. : Carboxy-terminal half of the Sendai virus C protein is responsible for both counteracting the antiviral action of interferon and down regulating the viral RNA synthesis. *J. Virol.*

## シベリアおよびアジアにおける鳥インフルエンザの疫学調査

研究分担者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）

共同研究者：岡崎克則、迫田義博（北海道大学大学院獣医学研究科）

**研究要旨** 新型ウイルス対策に資するため、シベリア、モンゴルおよび北海道においてカモの糞便 1,512 検体を収集した。これらの試料から H1N1、H2N2、H2N3、H3N2、H3N6、H3N8、H4N2、H4N5、H4N6、H5N2、H5N3、H6N2、H7N1、および H12N5 インフルエンザウイルス計 74 株を分離した。北海道に飛来したカモから分離された 4 株の H2 ウイルスの HA 遺伝子は、系統進化解析によっていずれもユーラシア系統に分類された。しかし、これらの H2 HA 遺伝子は 1957 年に出現したアジア型 H2N2 ウイルスのそれとは異なる亜群に属することがわかった。

### A. 研究目的

研究分担者らは新型インフルエンザウイルスの供給源が渡りガモの腸内ウイルスにあること、カモはそのウイルスを新型ウイルスの登場舞台と想定される中国南部までシベリアの営巣湖沼から運ぶことを証明した。さらに、北海道の渡りガモから分離した弱毒H5N4ウイルスを精製、不活化し、これをワクチンとして鼻腔内に投与したマウスは致死量の強毒H5N1ウイルス攻撃に耐過することを示した。

本研究の目的はシベリアおよびアジアにおける鳥インフルエンザの疫学調査を行って新型インフルエンザウイルスの亜型予測に資するとともに、調査で分離される弱毒ウイルスをワクチン製造および診断用抗原に供するため系統保存することである。

### B. 研究方法

#### 1) ウイルス分離および同定

2001年、8月末～9月初頭、バイカル湖畔およびウランバートル西方100～200kmで水禽の糞便1,170検体を採取した。同年10月初頭、北海道宗谷地区において126検体ならびに10月初頭～11月末に札幌市内で210検体を採取した。これらを発育鶏卵に接種して赤血球凝集因子を分離した。同定は標準抗血清を用いた赤血球凝集阻止試験およびノイラミニダーゼ阻止試験によった。

#### 2) 遺伝子解析

シベリアで採取されたカモの糞便から分離された5株、モンゴルの材料から分離された2株ならびに北海道の材料から分離された9株のNP遺伝子および北海道で分離された4株のH2ウイルスのHA遺伝子を解析した。ウイルスRNAを抽出し、これを鋳型、ランダムヘキサマーをプライマーとした逆転写酵素反応を行いcDNAを得た。インフルエンザAウイルスNPおよびH2亜型HA遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用い、各々の遺伝子断片を増幅し、それらを鋳型としたdirect sequencing法によって塩基配列を決定した。

#### 3) 系統進化解析

NP遺伝子の1,216～1,430塩基位、H2 HA遺伝子の40～1,084塩基位についてGenbank登録塩基配列と比較し、Neighbor-joining法を用いて進化系統樹を作成した。

### C. 研究結果

#### 1) 水禽糞便からのインフルエンザウイルスの分離

2001年8月、バイカル湖畔で採取した445検体の水禽糞便から4株のH3N8ウイルスおよび3株のH4N6ウイルスを分離した。同年9月にウランバートル西方100～200kmに散在する湖沼で採取し

た725検体から37株のインフルエンザウイルス(1 H1N1、1 H3N2、3 H3N6、11 H3N8、1 H4N2、12 H4N6、1 H5N2、6 H5N3、1 H7N1ウイルス株)を分離した。同年10～11月に稚内市大沼、浜頓別町クッチャロ湖および北海道大学構内で採取した342検体から30株のインフルエンザウイルス(8 H1N1、1 H2N2、4 H2N3、7 H3N8、1 H4N5、2 H4N6、4 H6N2、2 H12N5、1 H?N8ウイルス株)を分離した。

## 2) シベリア、モンゴルおよび北海道で分離されたカモ由来ウイルスNP遺伝子の系統解析

シベリア、モンゴルおよび北海道で採取したカモの糞便から分離したインフルエンザウイルス16株のNP遺伝子の塩基配列を決定し、Genbank登録配列とともに系統解析を行った。その結果、調べた16株のNP遺伝子はいずれもユーラシア系統に属し、二つの亜群に大別された。一方にはシベリアおよびモンゴルで分離されたウイルス株と北海道で分離された4株が属した。他方には北海道のカモから分離された4株が属した。北海道で分離された1株は2つの亜群が形成される前に分岐していた。シベリアで分離された株を含む亜群には1997年に香港で分離された強毒H5N1ウイルスのNP遺伝子が含まれていた。

## 3) 北海道で分離されたカモ由来H2ウイルスのHA遺伝子の解析

北海道で採取したカモの糞便から分離したH2インフルエンザウイルス4株のHA1領域をコードする塩基配列を決定した。それらの系統進化解析によっていずれのH2遺伝子もユーラシア系統に分類された。しかし、これらの遺伝子は1957年に出現したアジア型H2N2ウイルスのH2遺伝子とは異なる亜群に属することがわかった。ヒト由来H2ウイルスのレセプター結合に関与するアミノ酸配列はLeu236-Gly237-Ser238であったのに対し、鳥由来H2ウイルスのそれはいずれもGlu236-Gly237-Gly238であった。

## D. 考察

2001年、バイカル湖畔、モンゴルおよび北海道において水禽の糞便を採取し、それらから74株のインフルエンザウイルスを分離した。今回、これまで渡りガモからの分離報告が少なかったH2ウイルスが北海道のカモから分離されたことは興味深い。NP遺伝子の系統解析の結果、これらのH2ウイルスはシベリアのカモから分離された株ならびに1997年に香港で分離された強毒H5N1ウイルスと近縁であった。

H2ウイルス4株のHA遺伝子を系統解析したところ、いずれもユーラシア系統に分類されるものの1957年のアジア風邪出現の際にヒトのウイルスに導入されたH2遺伝子とは異なる亜群に属していた。レセプター結合に関与するアミノ酸配列から、これらのH2ウイルスはNeuAc  $\alpha$  2-3Gal結合を強く認識するものと考えられた。一方、ヒト由来H2ウイルスはいずれもNeuAc  $\alpha$  2-6Gal結合に親和性を持つことが予想された。

## E. 結論

シベリア、モンゴルおよび北海道で採取したカモの糞便から様々な亜型のインフルエンザウイルスを分離した。1997年に香港で分離された強毒H5N1ウイルスとNP遺伝子が近縁なH2ウイルスが北海道のカモから分離されたことは興味深い。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

香港 H5N1 インフルエンザウイルスの病原性発現の分子基盤

分担研究者 河岡 義裕 東京大学医科学研究所教授

**研究要旨** 1997年香港で、H5N1トリインフルエンザウイルスが18人のヒトに感染し、そのうち6人が死亡した。何故、トリのウイルスがヒトに対して強い病原性を発揮したかを明らかにするために、本ウイルスをプラスミドから人工合成し、その病原性をマウスを使って調べた。その結果、インフルエンザウイルスが哺乳動物で強い病原性を発揮するには、家禽における場合と同様、宿主蛋白質分解酵素によるHA分子の開裂のされやすさ、さらに、PB2蛋白質のアミノ酸の変異が重要であることがわかった。

**A. 研究目的**

1997年に香港で、H5N1トリインフルエンザウイルスが18人に感染し6人の死者を出した。感染患者から分離されたウイルスは全てニワトリに対して強い病原性を示すが、マウスに対する病原性は様々であった。それらのウイルスのマウスに対する毒力の違いは、幾つかの例外を除き、感染患者の病態の違いと一致していた。本研究は、香港 H5N1 トリインフルエンザウイルスが哺乳類に対して病原性を発現するメカニズムを明らかにする事を目的とする。

**B. 研究方法**

マウスに感染させると全身感染を引き起こし強い病原性を示す A/Hong Kong/483/97 (HK483)(H5N1)およびマウスの呼吸器局所でのみ増殖する病原性の弱い A/Hong Kong/486/97 (HK486) (H5N1)を我々が開発したリバーシジェネティクス法を用いて作出した。HK486については、我々が保有するウイルスストック中に2種類のヘマグルチニン(HA)、すなわち227番目のアミノ酸がSerのもの(486HA227S)およびIleのもの(486HA227I)が確認されたため、その両方をクローニングしウイルスを作出した。

HK483 および HK486 のウイルス RNA 遺伝子分節を交換したリアソータントウイルス、HK483 と HK486 の PB2 のキメラ蛋白質をもつウイルスおよび PB2 のアミノ酸に変異を導入したウイルスを同じくリバーシジェネティクス法を用いて作出した。

以上の変異ウイルスをマウスの呼吸気接種して、50%致死量および全身臓器でのウイルス増殖を調べる事によって病原性を比較した。

**C. 研究結果および考察**

**1. リバーシジェネティクス法を用いて作出した香港 H5N1 ウイルスの病原性：**リバーシジェネティクス法によって、全ての遺伝子をプラスミドから供給して作出した HK483 は、人からの分離ウイルスと同様にマウスに対して強い病原性を示した。一方、リバーシジェネティクス法によって作出した2種類の HK486 はマウスに対する病原性はいずれも HK483 に比べ低かったが、486HA227S をもつウイルスの方が486HA227I をもつウイルスよりマウスに対する致死性が高く、呼吸器における増殖能も高かった。

**2. HK483 および HK486 のリアソータントウイルスの病原性ならびに病原性に関与する遺伝子の同定:** HK483 および HK486 の全てのウイルス遺伝子分節を、1 つずつ交換したリアソータントウイルスを作成した。その結果、HK483 の PB2 を HK486 の PB2 に置換、あるいは HK483 の HA を HK486 の 486HA227I に置換すると、ウイルスは弱毒化される事が判明した。しかし、HA を 486HA227S に置換してもウイルスは弱毒化されずマウスに全身感染を引き起こした。一方、逆に HK486 の PB2 を HK483 の PB2 に置換した 486HA227S をもつ HK486 は強い病原性を獲得し、HK483 同様にマウスに全身感染を引き起こした。しかし、486HA227I をもつ HK486 の PB2 を HK483 の PB2 と置換しても、強い病原性は獲得されなかった。これらの成績は香港 H5N1 インフルエンザウイルスのマウスに対する病原性の違いに PB2 が強く関わっていることを示している。また、HK486 の HA の 227 番目のアミノ酸が Ser から Ile に置換すると、ウイルスの病原性が低下する事を示している。

**3. 病原性発現に関与する PB2 分子上のアミノ酸の同定:** HK483 および HK486 の PB2 では、8つのアミノ酸が異なっている。どのアミノ酸が病原性発現に関与しているかを調べるために、まず HK483 および HK486 の PB2 のキメラ蛋白質をもつウイルスを作成してマウスに対する病原性を調べた。その結果、627番目のアミノ酸(HK483はLys、HK486はGlu)または675番目のアミノ酸(HK483はLeu、HK486はIle)が重要であることが示唆された。次に、これらのアミノ酸をそれぞれ置換した PB2 をもつウイルスを作成して、マウスに対する病原性を比較した結果、HK483 の PB2 の 627 番目の Lys を Glu に置換すると、病原性を失い全身感染を起こさなくなる事が判明した。逆に、PB2 の 627 番目の Glu を Lys に置換した HK486 は強い病原性を獲得し、マウスに全身感染を引き起こした。以上の成績は香港 H5N1 インフルエンザウイルスの病原性発現に PB2

の 627 番目のアミノ酸が重要である事を示している。

**4. HA の開裂性が香港 H5N1 インフルエンザウイルスの病原性発現に与える影響:** HA の開裂性が香港 H5N1 インフルエンザウイルスのマウスに対する病原性に与える影響を調べるために、HK483 の HA の開裂部位を弱毒型に変異させたウイルスを作成した。このウイルスはマウスの呼吸器のみで増殖し、致死感染には至らなかった。

#### D. 結論

- 香港 H5N1 インフルエンザウイルスのマウスに対する病原性発現に、PB2 が強く関わっており、627 番目のアミノ酸が重要である。
- HA が易開裂性である事もまた香港 H5N1 インフルエンザウイルスの病原性発現に必須である。

#### E. 研究発表

1. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. **Science** 298:1840-1842, 2001.



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

インフルエンザウイルスの増殖における M2 蛋白質の役割

分担研究者 河岡 義裕 東京大学医科学研究所教授

**研究要旨** インフルエンザウイルスのM2蛋白質はイオンチャンネル活性を持ち、ウイルスの増殖に必要な不可欠であると思われていた。そこで、本蛋白質のウイルス増殖における役割を明らかにするために、M2蛋白質を持たない変異ウイルスを作製したところ、本ウイルスは親ウイルスよりは増殖能が劣るものの、培養細胞で多段階増殖した。さらに、M2蛋白質の一部を欠損したウイルスを作製したところ、この変異ウイルスは、マウスでの増殖は親ウイルスより劣っていたものの、培養細胞での増殖能は親ウイルスと変わらなかった。後者のウイルスは、生ワクチンの有望な候補になるかもしれない。

**A. 研究目的**

インフルエンザウイルスは3種類の膜貫通蛋白質、HA、NA および M2 蛋白質を持つ。そのうち M2 蛋白質はイオンチャンネル活性を持つ事が知られている。このイオンチャンネル活性はウイルスが細胞に侵入する際に重要な役割を演じると考えられている。すなわち、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたウイルス粒子内に M2 がプロトンを取り込み、粒子内の pH を下げることによって、膜融合後に RNP 複合体が M1 蛋白質から解離しやすくなると考えられている。しかし、この M2 イオンチャンネル活性は実際のウイルス粒子を用いて発見されたのではなく、M2 を培養細胞に発現させて、その膜電位を測定することによって証明されているのみであるので、実際のウイルス増殖における M2 イオンチャンネル活性の役割は明らかとなっていない。そこで本研究では、リバーシジェネティクス法によって M2 イオンチャンネル活性を持たないウイルスを作出して培養細胞とマウスにおける増殖を調べた。

**B. 研究方法**

インフルエンザウイルス A/WSN/33 (H1N1) の M 蛋白質遺伝子をコードする遺伝子を A/Udorn/307/72 (H3N2)のものに置換した親ウイルスをリバーシジェネティクス法によって作出した。M2 蛋白質の膜貫通領域(アミノ酸 25-43 番目)にイオンチャンネル活性があるので、この領域に変異を導入しイオンチャンネル活性を消失させるアミノ酸置換あるいは欠損を施した M2 をもつウイルスを作出し、MDCK 細胞およびマウスにおけるウイルスの増殖能を親ウイルスと比較した。

**C. 研究結果および考察**

**1. M2 蛋白質に変異を導入したウイルス：**M2 蛋白質の膜貫通領域に存在するアミノ酸、27 番目の Val、30 番目の Ala、31 番目の Ser、34 番目の Gln あるいは 38 番目の Leu を置換するとそのイオンチャンネル活性に影響を及ぼすことが報告されている。30 番目の Ala の Pro に置換または 29-31 番目のアミノ酸欠損させると、中性および酸性

両方の条件で完全に M2 のイオンチャンネル活性が失われる事が報告されている。また、27 番目の Val を Thr、または 31 番目の Ser を Asn に置換すると酸性条件でのみイオンチャンネル活性を示す事が報告されている。そこで、これらの変異 M2 をもつウイルスを作出して MDCK 細胞における増殖効率を調べた結果、いずれのウイルスも親ウイルスと差がなかった。

**2. M2 蛋白質の膜貫通領域を HA または NA の膜貫通領域に置換したウイルス：**イオンチャンネル活性が失われるとされている変異を M2 蛋白質に導入しても、ウイルスの増殖は親ウイルスと差がなかったが、M2 のイオンチャンネル活性を測定するのに用いられたパッチクランプ法の検出感度以下の活性が M2 に残っている可能性がある。そこで、M2 の膜貫通領域を HA あるいは NA のものに完全に置換したウイルスを作出して、増殖効率を調べた。これらの変異 M2 を持つウイルスは親ウイルスと比較して、増殖速度が遅く、プラークサイズも小さかったが、十分に多段階増殖可能であった。この成績は M2 の膜貫通領域を欠損させてもインフルエンザウイルスは培養細胞において増殖可能である事を示している。

**3. M2 蛋白質の膜貫通領域を欠損したウイルス：**M2 蛋白質の膜貫通領域を HA あるいは NA のものに置換したウイルスも培養細胞での増殖が可能であった。しかし、これらの変異 M2 蛋白質は膜貫通蛋白質としての性質を残しており、さらに HA あるいは NA の膜貫通領域にイオンチャンネル活性がない事を証明できない。そこで、M2 蛋白質の膜貫通領域の直前に停止コドンを入れることによって M2 蛋白質の膜貫通領域以下のアミノ酸を完全に欠損したウイルスを作出した。このウイルスの M2 はもはや膜蛋白質としてウイルス粒子には存在しない。このウイルスが培養細胞において増殖出来るか否かを調べた結果、親ウイルスと比較して増殖スピードが遅く、プラークサイズも極端に小さくなったが、やはり増殖可能であった。しか

し、増殖効率が著しく落ちたことから、M2 はイオンチャンネル以外にも何らかの機能を持っていると考えられる。

**4. M2 変異ウイルスのマウスにおける増殖性：**親ウイルスおよび作出した種々の M2 変異ウイルスをマウスに経鼻接種して、肺および鼻腔介のウイルス量を測定した。親ウイルスは肺および鼻腔介の両方でよく増殖したが、M2 蛋白質の 30 番目の Ala を Pro に置換したウイルスおよび 29-31 番目のアミノ酸を欠損させたウイルスは肺では親ウイルスと同様に増殖したが、鼻甲介では検出感度以下だった。一方、M2 の膜貫通領域を HA の膜貫通領域に置換したウイルスおよび膜貫通領域以下を完全に欠損したウイルスは、肺および鼻甲介いずれからも全く回収されなかった。

#### D. 結論

- ・インフルエンザウイルスの M2 蛋白質がもつイオンチャンネル活性は培養細胞におけるウイルスの増殖に必須ではない。
- ・マウスの呼吸器で効率良くウイルスが増殖するためには、M2 蛋白質のイオンチャンネル活性が必要である。

#### E. 研究発表

1. Watanabe T, Watanabe S, Ito H, Kida H, Kawaoka Y. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. **J Virol** 75:5656-5662, 2001.

アジア型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン蛋白の抗原構造に関する研究

分担研究者 本郷 誠治 山形大学医学部助教授

**研究要旨** アジア型インフルエンザウイルス (A/H2N2) は、1957年に登場し流行を引き起こしたが、11年後の1968年にはヒトの世界から姿を消した。A/H2N2のヘムアグルチニン (HA) は、11年間の流行期間中、終始169位に1本の糖鎖をもつだけで、その数を増加させていない。一方、現在も流行を起こし続けているA/H3N2ウイルスのHAは、1968年の出現当時には球状部に2本の糖鎖をもつにすぎなかったが、1975年には3本に、1986年には4本にその数を増やしている。また、A/H1N1ウイルスやB型ウイルスのHAも球状部に4~5本の糖鎖をもっており、糖鎖の数を増やすことによって効率よく抗体圧から逃れている可能性が強い。先に我々は、抗HA単クローン抗体によって選択されたエスケープ変異株の解析から、H2分子も131位、160位及び187位のいずれかに1本の糖鎖を獲得する潜在能力をもつことを明らかにした。また、これらの3つの部位に1~3本の糖鎖を人為的に付加した変異HA蛋白のレセプター結合能を調べた結果、糖鎖の数の増加に伴ってH2分子のレセプター結合能は低下し、3本の糖鎖が付加されるとほぼ完全にレセプター結合能を失うことを明らかにした。本研究では、さらに変異HA蛋白の性状を解析し、次の2つの結論を得た。1) 球状部の糖鎖の数の増加に伴ってH2分子の膜融合能は低下し、3本の糖鎖が付加されると、ほぼ完全に膜融合能を失う。2) 球状部に2~3本の糖鎖を獲得したH2分子はヒト血清との反応性が低下する。

**A. 研究目的**

A/H2N2ウイルスのHAは、1957~1968年の流行期間中、終始169位に1本の糖鎖をもつだけで、その数を増加させていない。先に我々は、A/H2N2ウイルスのエスケープ変異株を解析する過程で、このウイルスが、HA分子の131位、160位及び187位の3ヶ所のいずれかに1本の糖鎖を獲得する潜在能力を秘めていることを明らかにした。ところが実際に自然界に、131位、160位及び187位に糖鎖をもつような分離株は出現していない。一方、A/H3N2ウイルスのHAは、1968年には球状部に2本の糖鎖をもつだけであったが、1975年には3本に、1986年には4本にその数を増やしている。現在流行

を起こしているA/H1N1ウイルスやB型ウイルスも、HAの球状部に4~5本の糖鎖をもっており、糖鎖の数を増やすことによって効率よく抗体圧から逃れている可能性が強い。A/H2N2ウイルスでは、A/H1N1やA/H3N2ウイルスとは異なり、免疫からの回避に、HAの球状部に新たな糖鎖を獲得するという戦略を利用できなかった可能性を疑わせる。これまでに、131位、160位及び187位の3つの部位に1~3本の糖鎖を人為的に付加した変異HA蛋白を作製し、そのレセプター結合能を調べた結果、糖鎖の数の増加に伴ってH2分子のレセプター結合能は低下し、3本の糖鎖が付加されるとほぼ完全にレセプター結合能を失うことを明らかにした。本

研究では、さらに変異 HA 蛋白の性状の解析をすすめる、H2 分子の膜融合能及び抗原性はどのように変化するかという点について解明を試みた。

## B. 研究方法

131 位、160 位及び 187 位に 1~3 本の糖鎖をもつ HA 蛋白の発現：親株の HA cDNA に 1~3 本の糖鎖をもつような変異を導入した上で、発現ベクター pME18S に組み込み、COS 細胞で発現させた。

1. 細胞融合試験：発現 COS 細胞を TPCK-trypsin (5 µg/ml) で処理し、pH 5.0 の培養液に 5 分間さらした後、通常の培養液中で培養した。3 時間後、細胞をメタノールで固定し、ギムザ液で染色した後、多核細胞形成を観察した。

2. 免疫沈降法：発現 COS 細胞を <sup>35</sup>S-メチオニンでラベルし、1948~1954 年の間に生まれたヒトから得られた血清を用いて免疫沈降により回収した HA を、SDS-PAGE により解析した。  
(倫理面への配慮)

本研究では、作製した変異 HA 蛋白との反応性を調べるためにヒト血清を使用した。血清は保存されていたものを用い、年齢以外の、個人を特定できるような情報は一切ないため、倫理面での問題はないと判断した。

## C. 研究結果

131 位、160 位及び 187 位に 1~3 本の糖鎖をもつ変異 HA 蛋白の性状：131 位、160 位及び 187 位に 1 本、2 本もしくは 3 本の糖鎖をもつ合計 7 個の変異 HA 蛋白を COS 細胞で発現させ、その性状を 169 位だけに糖鎖をもつ野生型 HA と比較した。

1. 膜融合能：各変異蛋白を発現させた COS 細胞に細胞融合試験を行い、以下の成績を得た。

1) 野生型 HA では、ほぼすべての細胞が融合を起こしていた。131 位、160 位及び 187 位のいずれかに 1 本の糖鎖を獲得した蛋白を発現させた

細胞でも、融合は観察されたが、1 つの融合細胞に含まれる核の数が野生型よりも少なく、多核細胞形成が低下していた。これにより、1 本の糖鎖が付加された場合でも、HA の膜融合能は有意に低下すると結論される。2) 2 本の糖鎖を獲得した HA 蛋白の発現細胞の膜融合能は、著しく低下していた。3) HA が 3 本の糖鎖を獲得すると、融合はほとんど観察されなかった。以上の結果から、H2 分子に糖鎖を人為的に付加すると、糖鎖の数の増加に伴って、膜融合能は低下し、3 本の糖鎖を付加すると、活性をほぼ完全に失うことが明らかになった。

2. ヒト血清との反応性：COS 細胞で発現させた各変異蛋白とヒト血清との反応性を免疫沈降法を用いて調べた結果から、H2 分子の球状部に 2 本以上の糖鎖を付加すると、ヒト血清との反応性が低下し、抗原性が大きく変化することが明らかになった。

## D. 考察

A/H2N2 は、1957 年に登場し流行を引き起こしたが、11 年後の 1968 年にはヒトの世界から姿を消した。このウイルスは 1889 年にも流行を引き起こしたと推定されているが、この時も 10 年後には姿を消している。この事実は、A/H2N2 ウイルスが、ヒトの世界で短命に終わる宿命をもつ可能性を疑わせる。A/H2N2 ウイルスの HA は、11 年間の流行期間中、終始 169 位に 1 本の糖鎖をもつだけで、その数を増加させていない。一方、現在分離されている A/H1N1 や A/H3N2 ウイルス並びに B 型ウイルスの HA は、球状部に 4~5 本の糖鎖をもっており、糖鎖の数を増やすことによって効率よく抗体圧から逃れていると推測される。A/H2N2 では、糖鎖を増やせない原因があり、そのために抗体圧に対してアミノ酸置換だけで対応せざるをえず、これが H2 分子の可変性の喪失を早め、A/H2N2 ウイルスを短命で終わらせた一因になっている可能性が強い。今回の研究により、糖鎖の付加は H2 分子のレセプター結合能だけでなく、