

200301229 A

厚生労働科学研究研究費補助金

(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保
に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小田切孝人

平成 16 (2004) 年 3 月

目次

平成 15 年度

I. 総括研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

主任研究者： 小田切孝人 _____ P1

II. 分担研究報告書

1. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

田代真人 _____ P7

2. 遺伝子操作法で作製したインフルエンザワクチンの安全性と有効性に関する研究

河岡義裕 _____ P14

3. リバースジェネティクス技術を用いて作製した弱毒化 H5N1 ウイルスの安全性に関する研究

今井正樹：共同研究者 喜田宏 _____ P18

4. 新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討に関する研究

二宮 愛 _____ P22

5. 現行のインフルエンザワクチンの効果と安全性に関する研究

神谷齊 _____ P26

6. 新型インフルエンザ用ワクチン製造に用いる GMP 対応細胞株の確立と安全性確保に関する研究

佐藤 征也：共同研究者 桑原 靖、城野 洋一郎、福家 功、五反田 亨 P33

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P36

IV. 研究成果の刊行物・別刷（別添）

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
総括報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室 室長 小田切孝人

研究要旨

新型インフルエンザはトリインフルエンザウイルスに由来する新型ウイルスによって起こり、汎流行を起こして甚大な健康被害と社会的損失・混乱をもたらす。新型インフルエンザ対策の根幹は、安全かつ有効なワクチンの緊急開発・大量製造と接種体制の準備と実施にある。リバーシジェネティクス法という新技術が開発されたことにより、ワクチン開発は短期間で可能になったが、一方では新たに解決しなければならない諸問題点が浮上してきた。第 1 は遺伝子組み換えに用いるプラスミドベクターの知的所有権にからむ使用制限の問題、第 2 はワクチン開発の元株となる弱毒化ウイルスを回収するための GMP 基準に対応した特殊な細胞（Vero 細胞）の使用制限の問題、第 3 は培養細胞ワクチンの製剤基準設定と安全性に関する国際基準化の問題、第 4 は新型インフルエンザワクチンのヒトへの免疫効果の検証とアジュバントワクチンの開発およびそのライセンス化の問題などである。

本研究では、これらの諸問題を解決するための基盤となる以下の研究を行った。①遺伝子操作法、細胞培養法によって製造されるワクチン製剤開発のための国際基準の作成を WHO に協力して行った。②発育鶏卵で高増殖する A/PR8 ウイルス株遺伝子をバックボーンとしたリバーシジェネティクス系を構築した。③リバーシジェネティクス法を用いて作製した弱毒化 H5N1 ウイルスの安全性をニワトリおよび培養細胞を用いて検証した。④弱毒化 H5N1 ウイルスをホルマリンで不活化した試作ワクチンを作製し、アルムアジュバント非添加および添加における免疫原性についてマウスで検討した。⑤現行のインフルエンザワクチンの効果と安全性に関する研究を行い、小児におけるワクチン接種量と副反応に関する情報収集とその解析から、ワクチンの有効性を検討する。⑥新型インフルエンザワクチン製造に用いる GMP 対応細胞株の確立と安全性確保に関する研究を行い、わが国で保有している GMP 対応細胞株が新型インフルエンザワクチン開発に使用可能か検討した。

研究組織

主任研究者	河岡義裕 東京大学医科学研究所教授
小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部室長	今井正樹 国立感染症研究所ウイルス第 3 部主任研究員
分担研究者	二宮愛 国立感染症研究所ウイルス第 3 部研究員
田代真人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部部長	神谷 齊 国立療養所三重病院院長 佐藤征也 デンカ生研株式会社部長

A. 研究の目的と背景

インフルエンザウイルスは 8 本に分節された RNA を遺伝子として持つことから、2 種類のウイルスが同一の宿主に混合感染すると、簡単に遺伝子再集合体が形成され、

理論的には256通りの遺伝子再集合体ができる。自然界にはHAの亜型が15種類、NAの亜型が9種類存在し、ウイルスの混合感染による遺伝子再集合で、これまでヒトの世界で流行したことないHA、NA亜型を持つウイルスが出現した場合には、殆どのヒトが新型ウイルスに対する免疫を持っていないことから、全世界を巻き込んだ大流行となる。A型インフルエンザでは数10年周期で新型ウイルスがヒトの世界に出現して地球レベルでの大流行を起こし、大きな健康被害と社会的損失をもたらす。現在ヒトの世界で流行している香港型が出現して36年、ロシア型では27年が経過しており、これまでの歴史的な経緯からみても新型ウイルスの出現が危惧される。

A型インフルエンザは人畜共通感染症であり、自然宿主である水禽類には全ての亜型ウイルスが存在し、また、様々な亜型ウイルスは哺乳動物にも広く分布している。新型ウイルスの形成の場として、幾つかの仮説が提唱されているが、その一つがブタである。ブタはトリとヒトのインフルエンザウイルスの両方に感受性を持つことから、これらのウイルスがブタに重感染するとトリの亜型HA、NA遺伝子を取り込んだ新型ヒトウイルスが出現すると考えられている。1957年のアジア型も1968年の香港型もHA、NAはトリウイルスから由来しており、それらの起源は中国南部といわれている。当地では野生の水禽が越冬する湖沼に家禽やブタとヒトが密接に生活していることから、トリ、ブタ、ヒトという感染経路が容易にでき、異種間を伝播する間には新型ウイルスとなる遺伝子再集合体が形成される可能性が考えられる。

一方、1997年には、香港でニワトリの強毒ウイルスH5N1がヒトに直接感染し、18名の感染者中6名が死亡するという事例が起こった。同様に2003年2月には香港から福建省に旅行した家族でH5N1ウイルスの感染例が発生し、2名が死亡している。さ

らに、同年11月からは韓国、日本、ベトナム、タイ、中国、ラオス、カンボジア、インドネシアで同亜型の高病原性トリインフルエンザが家禽の間で大流行し、ベトナム、タイではヒトへの感染も確認されており、感染者34人のうち23人が死亡した。わが国での家禽における流行は、ウイルス感染が確認された養鶏場のニワトリの全殺処分により制圧に成功していることから、現時点では新たなH5N1ウイルスの流行は起こっていない。しかし、東南アジア諸国では、流行の制圧ができないことに加えて、これらの地域ではヒトのインフルエンザの流行シーズンとも重なっていることから、高病原性トリウイルス遺伝子をもった新型インフルエンザの発生とそれによるパンデミックという最悪の事態も想定した対策を早急に講じる必要が出てきている。中でも、その中心的な役割を担うのはワクチン開発である。

近年においては、プラスミドを用いたリバーシジェネティクス法が確立されていることから、強毒型の野生株が分離されてから、それを用いて数週間以内に弱毒型高増殖株を作製することが可能となった。しかし、高病原性トリインフルエンザウイルスに由来する不活化ワクチンの開発には、リバーシジェネティクス法に用いるプラスミドやウイルスを回収するための細胞にかかる知的所有権による使用制限の問題が起こってきた。

そこで本研究では、これらの経緯を踏まえて、1) 高病原性トリインフルエンザウイルス由来の不活化ワクチン製造に関する安全性評価の国際基準策定への参画、2) リバーシジェネティクス法で開発したワクチンの動物実験における安全性、有効性の検証、3) アジュバント併用ワクチンの効果と抗原量の検討、4) リバーシジェネティクス法に用いるGMPに準拠した細胞株の検索、および5) 新型インフルエンザワクチンが実用化されたときに、その効果

と安全性を現行の不活化ワクチンと比較できるように、現行のワクチンを用いた乳幼児における有効性、至適投与量、安全性の検討、などに関わる基礎的な研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1 新型インフルエンザワクチン開発・製造・安全性評価のガイドラインの作成。

世界各国のワクチン開発技術の実体を検討し、各国のインフルエンザワクチンに関する製剤基準、組み換え生物・組み換え医薬品としての評価の現状、またそれらの考え方の基盤を整理・検討した。また、WHO における多くの新型インフルエンザ対策会議に参加し、ガイドラインに関する資料の作成・提出を行った。

2 リバーシジェネティクス法による新型ワクチン候補株作製系の確立。

リバーシジェネティクス法により HA 遺伝子改変ウイルスを作製するために、孵化鶏卵で高増殖する A/PR/8/34(H1N1) ウイルス遺伝子をバックボーンとする 12 プラスミド系を構築した。

3 弱毒化ウイルスの病原性試験。

リバーシジェネティクス法により作製した弱毒型 H5N1 ウイルスの病原性は、孵化鶏卵における増殖性、ニワトリの脳内接種、静脈内接種における臨床症状、及びウイルスブラック形成におけるトリプシン依存性を指標にして評価した。

4 不活化試作ワクチンの免疫原性の検討。
弱毒化 H5N1 および H7N3 をフォルマリンで不活化した試作ワクチンを作製した。これにアルムアジュバント添加または非添加したものを BALB/c マウスに皮下接種し、異なる抗原量における免疫応答について検討した。

5 現行のインフルエンザワクチンの乳幼児における有効性・安全性の検討。

13 歳未満の小児における至適ワクチン接種量と安全性を検討するために、6 歳未満に

は 0.25CC、6 歳以上-13 歳未満には 0.5CC をそれぞれ 2 回接種し、接種後の副反応について調査した。

6 ワクチン製造株作製用の GMP 準拠 Vero 細胞の検討。

国内インフルエンザワクチンメーカーがそれぞれ所有するワクチン製造用の Vero 細胞が、リバーシジェネティクス法に採用できるか否かをウイルス回収効率をもとに検証した。

C. 結果と考察

1 リバーシジェネティクスによる新型インフルエンザワクチンの開発・製造・安全性評価のガイドライン作成。

本研究の一環として WHO のガイドライン作成に参画した。現在、WHO がまとめたガイドライン原案を要約すると、1) 新型ワクチン株はヒトにとって病原性が低く、孵化鶏卵で高増殖する A/PR/8/34 株遺伝子をバックボーンとする 8 または 12 プラスミドを用いたリバーシジェネティクスで作製される。2) 回収したウイルスはニワトリ及びフェレットにおいて病原性が確認されるまでは、BSL3 にて取り扱う。3) 安全性の確認された株を用いたワクチン製造は、BSL2+の条件で行う。

弱毒化組み換えワクチンのバックボーンとして PR8 株が採用されたのは、ヒトに対する病原性が極めて低いことや、現行の不活化ワクチンの製造株となる高増殖株作製のバックボーンとして用いられているという実績による。この選択は、現時点では、妥当なものであるが、PR8 株を用いた組み換えウイルスがヒトに感染伝播することは否定できない。従って、新型ワクチンの製造に際しては、製造従事者への感染さらには製造施設からの流行拡大が起こらないような細心の注意が必要である。わが国では、このような観点から新型インフルエンザワクチンの製造に対応できるように、平成 10 年に国の補助により各ワクチン製造メカ

一の施設を BSL2+に整備した。しかし、より安全性を重視するならば、トリ由来の弱毒ウイルスをバックボーンに用いることも考慮すべきかもしれない。一方、トリインフルエンザウイルスは人に対して免疫原性が弱く、現行のスプリットワクチンという形態では使用できない。このことから、アジュバントワクチンの開発とその安全性の検証、ライセンス化に向けた研究や臨床試験などが課題となる。

2 A/PR/8/34 ウイルス株遺伝子をバックボーンとしたリバーシジェネティクス系の構築とそれによって作製された弱毒化 H5N1 組み換えウイルスの病原性の検証。

WHO のガイドラインに従って、本研究では、A/PR/8/34 をリバーシジェネティクスのバックボーンに採用し、組み換えプラスミドベクターの構築を行った。この系を用いて元株の A/PR/8/34 の回収を行ったところ、 10^{10} PFU/ml とひじょうに高いウイルス産生が得られることが分かり、高病原性トリインフルエンザウイルスから弱毒型のワクチン試験株の作製に有用なリバーシジェネティクス系が完成した。

本研究では、2003 年にヒトに感染し、それによって死亡したヒトから分離した高病原性トリインフルエンザウイルス A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) の NA 遺伝子と弱毒型に改変した HA を A/PR8 バックボーンに組み換えた H5N1 弱毒株を作製し、その安全性をニワトリへの接種実験および培養細胞におけるトリプシン依存性試験で検証し、作製された組み換えウイルスが弱毒化されていることを確認した。

リバーシジェネティクス系および安全性評価系が構築されたことにより、技術的には国内外いずれの地域で高病原性トリインフルエンザウイルスの流行が起こっても、その流行株を用いて速やかにワクチン株開発は可能である。しかし、ワクチン製剤としてのライセンス化には、プラスミドベク

ターにかかる知的所有権などの問題解決が必要である。

3 トリインフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバントワクチンの検討。

1997 年の H5N1 の流行の際に、我々は弱毒化ウイルスを作製し、現行のワクチンと同様のスプリットワクチン、全粒子ワクチンをそれぞれ試作して、ヒトに対するワクチン効果について検討した。その結果、トリインフルエンザウイルスの表面抗原を持つワクチンはヒトに対して免疫原性が殆どないことが判明した。そこで免疫原性をあげるためにヒトでの使用が認可されているアルムアジュバントの添加による免疫効果について検討し、さらに、アジュバントの添加により抗原量を減少させることができるかなどについてマウスを用いて検討した。その結果、アジュバント添加により抗原量を 1/10 に減少させても非添加群に比べて有意の抗体上昇が得られることが確認された。さらに、免疫応答は、H5N1 ウイルスの方が H7N3 より高いことが示された。このことから、トリインフルエンザウイルスを用いた新型ワクチンとして、アルムアジュバントワクチンの開発が有効であることが示唆される。これらの成績は、ヒトにおけるアルムアジュバント開発やライセンス化に有用な情報となる。

4 現行の HA ワクチンの接種基準の見直しと安全性に関する検討。

わが国では 13 歳未満の小児における現行の HA ワクチンの接種回数は 2 回であるが、この接種回数における接種量を米国の場合と比較すると少ない。そこで小児における至適接種量の検討と接種量の増加に伴う副作用について検討した。次年度においてこれらの分析結果が明らかになり、この情報は、新型インフルエンザワクチンの接種体制の検討にとって有用な情報を提供することになる。

5 ワクチン製造株作製のための GMP 基準に準拠した細胞株の検索と開発。

リバースジェネティクス法の完成により、流行株を弱毒化したワクチン製造株の開発は数週間で可能になった。しかし、ワクチン製剤としてヒトに使用するためには、種ウイルスの作製過程は全て GMP に準拠し安全性の担保された細胞で行われなければならない。このことから、欧米のワクチンメーカーでは WHO が推奨した Vero 細胞 (CCL 81) からワクチン製造用の細胞株を独自に開発した。これらは特許により所有権が保護されていることから、入手は不可能である。そこで、わが国でも GMP 対応の細胞株の構築が必要である。本研究では、国内の各ワクチンメーカーがワクチン製造用に開発した Vero 細胞を提供してもらい、リバースジェネティクス法に使用できるかウイルス回収量を指標にして感度を検討した。その結果、既存の細胞を採用することは難しいことが明らかになった。このことは、わが国においてはワクチン用の弱毒株を作製できてもヒトに用いるワクチン製造株を作製ではできないことを示している。

新型インフルエンザ対策においてワクチン株開発は根幹をなす重要な部分であることから、リバースジェネティクス法に採用できる GMP-細胞株の開発を緊急に実施しなければならない。

D 結論

新型インフルエンザ対策の根幹の一つは、流行株から弱毒化ウイルスを可能な限り迅速に作製し、ワクチン開発を行うことである。本研究ではこの目標を達成するために、ヒトに対して病原性が低く、孵化鶏卵で高増殖性する A/PR/8/34 株をバックボーンとするリバースジェネティクス系を構築した。この手法を用いたワクチンの開発には国際的基準の策定が必要であり、本研究も WHO のガイドライン作成に貢献した。また、ト

ラインフルエンザウイルスを用いたワクチンにはアルムアジュバントの添加が有効であり、これによって抗原量を 1/10 に減少させることが可能であることが示唆された。また、リバースジェネティクス法でワクチン製造用の種ウイルスを作製するための GMP-細胞の開発をわが国においても早急に進める必要があることが示された。

E 研究発表

1 論文発表

1 Masaki Imai, Shinji Watanabe and Takato Odagiri (2003) Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. Arch. Virol. 148, 1873-1884

2 Shinji Watanabe, Masaki Imai, Yoshiro Ohara and Takato Odagiri (2003) The influenza B virus BM2 protein is transported through the trans-Golgi network as an integral membrane protein. J. Virol. 77, 10630-10637

3 Noriko Nakajima, Yasuko Asahi-Ozaki, Noriyo Nagata, Yuko Sato, Florencio Dizon, Fem J. Paladin, Remigo M. Olveda, Takato Odagiri, Masato Tashiro and Tetsutaro Sata (2003) SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. Jpn. J. Infect. Dis., 56, 139-141

4 Chiharu Kawakami, Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Setsuko Nakajima, Tsuya Munemura, Miwako Saikusa, Yozo Noguchi, Kikushige Fujii, Mikio Takaoka, Reiko Ito, Toshinori Saito, Takato Odagiri and Masato Tashiro (2003) Isolation of influenza AH1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan.

Jpn. J. Infect. Dis., 56, 110-1131.

5 二宮愛、小田切孝人 (2003) SARS の

診断。臨床医 29、1922-1929

6 小田切孝人 (2003) 近年のインフルエンザの流行状況。Pharma Medica 21, 23-28。

7 小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代真人 SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果。インフルエンザ、5、35-24、2004

2 学会発表

1 T. Odagiri Detecting human and novel influenza viruses for vaccine preparation and pandemic preparedness. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections Panel, Yokohama, January 8-10, 2003.

2 S Watanabe, M Imai and T Odagiri The influenza b virus BM2 protein is transported in cytoplasm through the trans-golgi network as an integral membrane protein. 12th International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June (2003)

3 小田切孝人、西藤岳彦、齊藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、山下和予、岡部信彦、田代真人。2002/2003 シーズンのインフルエンザウイルス流行株について。第24回衛生微生物技術協議会研究会。福岡市、7月、2003

4 小田切孝人 SARS の実験室診断 第24回衛生微生物技術協議会。福岡市、7月、2003

5 小田切孝人 SARS のウイルス学的診断とワクチン開発の展望 第7回日本ワクチン学会 名古屋、10月2003

6 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小田切孝人。リバーシジェネティクス法によるB型インフルエンザウイルス BM2 変異株の作製と BM2 蛋白質の機能解析。第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10月(2003)。

7 森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸、

小田切孝人、倉根一郎、田代真人。重症急性呼吸器症候群 (SARS) の血清診断。第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10月(2003)。

8 板村繁之、二宮愛、西藤岳彦、森川茂、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代真人。RT-PCR 法による重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの検出感度の検定。第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10月(2003)。

9 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。2002/2003 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株。第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10月(2003)。

10 中島典子、尾崎康子、永田典代、佐藤由子、樋口好美、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎。ホルマリン固定パラフィン法米剖検肺組織標本における SARS コロナウイルス感染細胞の同定。第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、10月(2003)。

11 M Imai, S Watanabe and T Odagiri Integral membrane protein BM2 of influenza B virus is a necessary component for generation of infectious virus. Options for the Control of Influenza V, Okinawa, October, 2003.

F. 知的所有権の取得状況

なし

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

国立感染症研究所 ウイルス第3部部长 田代真人

研究要旨 新型インフルエンザに対しては、緊急にワクチンを開発・製造する必要があり、安全性・有効性に関しては、通常のワクチンに対する対応では対処できない。そこで、現在緊急事項となっている鳥高病原性H5N1型インフルエンザに対するワクチン開発・製造について、安全性を最大限に確認した上で、迅速に供給に結びつけるためのガイドライン作成を、WHOに協力して行った。

A. 研究目的

新型インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に関しては、1997年の香港H5N1型、2003年の香港H5N1型、2003年のH7N7型、2004年のベトナムH5N1型に対するワクチン開発が、WHOを中心とした国際協力の下に行われた。この際に、WHOインフルエンザ研究ネットワークが協力してワクチン製造株を開発し、これをWHOが各国のワクチン製造メーカーに無償で提供して、ワクチンの緊急大量製造を行うということが取り決められている。1997年のH5N1型ワクチン開発においては、リバーシジェネティクス法によって強毒型ウイルスを弱毒化し、これを製造候補株として試験ワクチンの製造を行った。しかし当時は、国内には生物学的製剤GMPは施行されておらず、また国際的にも品質規格に関するガイドラインや取り決めは無かった。その後、リバーシジェネティクスに関する技術改良が進み、技術的には、新型ワクチン製造候補株の作製は、2週間適度で達成できることが期待される状況となっている。しかし一方では、2003年のH5N1型に対するワクチン開発においては新たな問題が生じている。ワクチン候補株の開発はWHOが中心となって、世界中が協力して行い、その開発に関するガイドラインを作成することとなった。この根底には、第1に、リバ

ースジェネティクス法に関する特許が米国の企業によって押さえられていること、またこれに必要な細胞株が欧米の企業によって特許をとられていること等により、知的所有権（IP）問題を解決する必要がある。次に、ヒト用のワクチンには、既に欧米で承認が得られているウイルス株（PR8）との遺伝子再集合体を用いる必要があること、GMPに準拠したワクチン候補株の開発が要求されるようになったこと、安全性と有効性に関する臨床試験が必要になったこと、これに関しては国際協力の下に国際的な基準に基づいて行われること、わが国のインフルエンザワクチンに関する生物学的製剤基準と国際基準との整合性を図らねばならなくなったこと、などの問題点が明確になった。

さらに、1997年香港株に対するワクチン開発の経験から、H5N1型に対する現行ワクチン製剤では、ヒトに対しては防御免疫を十分には誘導できず、アジュバントの添加が不可欠であることが示唆され、新たなワクチン製剤の剤型とその臨床試験が必要となっている。いずれも、緊急に対応せねばならない課題であるが、特に2004年初頭から問題となっている東アジア諸国における高病原性鳥インフルエンザの流行に際しては、新たにワクチン開発が必要であり、これらの問題解決が最優先課題となっている。

そこで、WHO世界インフルエンザ計画のメンバーとして、新型インフルエンザワクチン、特にH5N1型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに由来するヒト分離株に対する、不活化インフルエンザワクチンの開発、製造に関する安全性評価に関するWHOのガイドラインの作成を行った。

B. 研究方法

世界各国のワクチン開発技術の現状を検討し、緊急ワクチン開発に対して現実的に使用可能な技術を整理した。また各国のインフルエンザワクチンに関する製剤基準、組み換え生物・組み換え医薬品としての評価の現状、またそれらの考え方の基盤を整理・検討した。また、ウイルスの病原性に関する理論基盤およびその検証方法、ヒトおよび動物への安全性を検討した。一方、緊急事態における時間的な要因と安全性・有効性検証とのバランスについても検討した。これらについて、WHO世界インフルエンザ計画の内部で検討を繰り返し、ワクチン開発および製造に関する安全性評価のガイドラインをまとめた。

C. 研究成果

現時点でまとめたWHOのガイドライン原案は以下の通りとなっている。現在世界各国の専門家に送付して、意見聴取を行っているところである。

Production of influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses

An Interim Biosafety Risk Assessment May 29 2003

Introduction

The 1997 and 2003 cases of human H5N1 infections in Hong Kong and the 2003 cases of human H7N7 infections in the Netherlands were caused by highly pathogenic avian influenza viruses. It is generally accepted that our continued exposure to influenza viruses circulating in wild and domestic avian species, poses a pandemic threat and there are now world-wide efforts to develop emergency prophylaxis measures for pandemic influenza. It will be necessary to quickly develop safe vaccine strains capable of growth in eggs or mammalian cells as soon as a pandemic warning is received and to produce vaccine according to epidemiological demands. This interim risk assessment is intended to provide guidance to vaccine manufacturers for production of pilot lots of vaccine for experimental use. Each manufacturer should prepare their own risk assessment, taking into account local working practices,

local biosafety control measures and local environmental control measures. The examples used in this risk assessment relate to an H5N1 vaccine development project, but the arguments are applicable to vaccine production from any potential pandemic virus. As more information becomes available, the risk assessment will be updated and should the need arise for large scale vaccine production, a revised risk assessment will be produced.

The influenza virus genome consists of 8 segments. It is likely that a high growth reassortant will provide the basis for pandemic vaccine development. The reassortant will contain the haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins from the novel avian or human virus and the remaining 6 proteins derived from a human influenza virus, such as A/PR/8/34 (H1N1). If a suitable apathogenic virus is available, reassortants may be produced by conventional technology. In the event that no suitable apathogenic strain is available, the vaccine virus will be a reassortant containing the HA of a highly pathogenic influenza virus, where the HA gene has been modified to remove the multi basic amino acids at the HA connecting peptide. The modifications to the HA will be done to remove the known determinants of high pathogenicity. Reassortants will be produced by reverse genetics using either an 8 plasmid or 12 plasmid strategy:

8 plasmid system

Eight plasmids, each encoding one of the influenza virus genes will be under the direction of the pol I-pol II expression system.

12 plasmid system

Eight plasmids, each encoding one of the influenza virus genes will be under the direction of the pol I expression system. Four plasmids will express PB1, PB2, PA and NP proteins.

Virus rescue

Virus will be rescued from plasmid transfection of a Vero cell line approved for human vaccine production. Reassortant virus will contain six internal gene segments of PR8 virus and the NA and modified HA segment of the avian virus. The virus will subsequently be grown in eggs or in mammalian cells.

Pathogenicity testing

Virus pathogenicity will be assessed in chickens and ferrets.

Vaccine production

Each company to briefly describe their own production process.

Hazard Identification

Hazards associated with the recipient virus

The recipient influenza virus will be the human strain PR8. This is a virus that has had extensive passage in mice, ferrets and chicken eggs. The result of such a passage history is almost complete inability to replicate in man and complete attenuation for man (Beare et al, 1975).

The reason for selecting PR8 is its capacity for high growth in not only mammalian cells, but also in embryonated chicken eggs. Ever since the late 1960's PR8 virus has been used to produce 'high growth reassortants' in combination with the prevailing influenza A vaccine strain and use of such reassortants as vaccine strains has increased vaccine yield many-fold. These reassortants have been produced by a combination of mixed infection of eggs with PR8 and the vaccine strain and a selection system based on use of anti-PR8 antibody and growth at high dilution.

There are no risks to human health from the PR8 virus.

Hazards arising from the inserted gene product

The products of the inserted genes will be the modified HA and NA of an H5N1 virus. The HA will have been modified so that the multi basic amino acids at the HA connecting peptide will be reduced to a single basic amino acid. These influenza proteins alone are not inherently infectious or harmful.

Hazards arising from the alteration of existing pathogenic traits

The influenza HA spike protein has specificity for sialic acid receptors on cell surface molecules. The HA's present on human influenza A viruses preferentially bind to cell receptors containing α 2, 6 linked sialic acid residues, whereas avian influenza viruses preferentially bind to α 2, 3 linked sialic acid (Rogers and D'Souza, 1989). Human tracheal cells have mainly α 2, 6 linked residues (Nelson et al, 1993), so the acquisition of an avian HA by PR8 virus is expected to minimise potential binding to human respiratory epithelial cells. Although the α 2, 3 receptor specificity of avian viruses will reduce the efficacy of such binding, it may not completely prevent infection in man. Beare and Webster (1991) were successful in infecting volunteers with a variety of avian influenza viruses, although replication was poor. However Beare and Webster found that extremely large quantities of avian viruses (between $10^{6.8}$ and $10^{9.2}$ egg infectious doses) were needed for replication in man and that it was not possible to induce person-to-person transmission. In 1997, infections of man with an avian H5N1 virus also took place in Hong Kong, although replication in these cases was much better,

probably due to the virulent nature of the virus. In Hong Kong, people were exposed to high titre H5N1 virus in contaminated faeces, which may have been one of the reasons for virus transmission from birds to man. However, as in the experimental studies, there was little or no person to person transmission of the 1997 H5N1 virus. This was also the case with the more limited occurrence of human infection with the avian H9N2 virus in 1999. Therefore in conclusion, the presence of an H5 HA on the surface of the H5N1xPR8 reassortant virus is likely to exhibit extremely weak binding to human cells with very low probability of human infection.

The HA protein of influenza virus must be cleaved into HA1 and HA2 by host cell proteases for a productive infection. Pathogenicity of H5 and H7 influenza A viruses for poultry is largely determined by the presence of multi-basic amino acids at the HA connecting peptide. The HA's of highly pathogenic viruses can be effectively cleaved by ubiquitous furin like proteases, which are expressed in most organs of birds and man. However, the HA's of non-pathogenic viruses contain a single basic residue at the connecting peptide which can only be cleaved by trypsin like proteases which are restricted to certain cell types e.g. epithelial cells lining the respiratory tract of man and the gut of birds. Thus HA cleavability determines tissue specificity and is a major determinant of pathogenicity. Direct evidence has been obtained that both HA cleavage and HA receptor specificity has an effect on tissue tropism of an avian H7N1 virus, A/Fowl Plague/Rostock/34 in chicken embryos (Feldmann et al, 2000). Similarly, the available evidence from the 1997 H5N1 infections, demonstrate that the high degree of pathogenicity in chickens, mice and ferrets was directly related to the possession of multi basic amino acids. Studies performed at the WHO CC Tokyo (M Tashiro, unpublished data), have demonstrated that removal of the basic amino acids changed H5N1 infections from a fatal systemic infection to a localised non-pathogenic infection in chickens, mice and ferrets. Hatta et al (2001) have also shown by reverse genetics that high cleavability of H5N1 HA due to the presence of multi-basic amino acids, was an essential requirement for a lethal mouse infection. It is not of course possible to examine pathogenicity of influenza virus infection in man, but an examination of H5N1 viruses by Gao et al (1999) has provided evidence that pathogenicity in mice resembles that in man. The occurrence of multiple organ failure after human H5N1 infections is suggestive of an unusual tissue tropism, but no evidence for viral replication outside the lung has been found (To et al, 2001). Therefore the available evidence suggests that virulence of the 1997 H5N1 viruses for man was related to the presence of multibasic amino acids. It is therefore considered advisable to remove the basic amino acids from the 2003 H5N1 virus HA in order to reduce the potential for harm to man. This procedure will also increase safety of the reassortants for avian species (see later under environmental risk assessment).

The choice of the PR8 strain for reassortment is also because of its proven attenuation for man. Published information indicates that a PR8 reassortant with a 6:2 genotype (6 segments from PR8, HA and NA from a wild-type human influenza virus is avirulent in man (Florent, 1980; Beare and Hull, 1971; Beare et al, 1975; Oxford et al, 1978). Indeed Florent et al (1977) and studies performed at the WHO CC Tokyo (M Tashiro, unpublished data) have shown that the degree of attenuation increases as reassortants include more PR8 genes. In this project, reassortants derived from the 2003 H5N1 virus will contain six out of eight viral genes from PR8 which is the maximum achievable within the scientific aims of the work. It is therefore expected that a reassortant bearing 6 internal genes of PR8 virus and the NA and modified HA of the H5N1 virus will also be attenuated for man.

All the above evidence on virus replication in man is based on reassortants with HA's derived from human influenza viruses, which preferentially bind to cell receptors abundant in human respiratory epithelium (α 2, 6 linked sialic acid residues). The reassortants created in this project contain an avian H5 HA which has a preference for α 2, 3 linked residues, so that there is little expectation that the H5N1 reassortants will be able to bind to and replicate in human cells. Whilst it is clear from the Hong Kong experience of 1997 that H5N1 influenza viruses, which displayed α 2, 3 sialic acid specificity could replicate in humans, it must be noted that influenza virus pathogenicity does not depend solely on HA, but is a polygenic trait and the 1997 H5N1 virus had unusual PB2 and NS1 genes which influenced pathogenicity. Changes in the PB2 gene of the 1997 H5N1 viruses were sufficient to attenuate them for mice (Hatta et al, 2001) and changes in the NS1 protein rendered these viruses resistant to the effects of interferons and other cytokines produced as part of the innate immune response (Seo et al., 2002). The NS1 changes conferred a highly virulent phenotype which allowed replication to proceed unchecked in vivo. In this case even a virus with a poor affinity for its receptor was able to replicate (although not to transmit). In contrast viruses with a PR8 internal gene constellation are clearly sensitive to the innate immune restrictions which will prevent the establishment of infection by an avian virus in humans. This may well explain why in avian influenza outbreaks before 1997, no evidence of transmission from birds to man has been noted and also why during many years of laboratory handling of high titre avian viruses (one of which [A/FPV/Dobson] is known to contain a gene which adapts it for replication in mammalian cells), no workers have apparently been affected by these viruses (Almond, 1977).

The H5N1xPR8 reassortants created in this project will not contain the gene constellation considered necessary for pathogenicity in chickens, mice and ferrets.

Reassortants derived from PR8 have been used routinely for production of inactivated influenza vaccines for the past 30 years. This work involves production of many thousands of litres of infected egg allantoic fluids, which

will create substantial aerosols of reassortant virus within manufacturing plants. Most of the reassortants were made from wild type human strains that had not yet been in widespread circulation. Thus, although the manufacturing staff would be susceptible to infection with the wild type virus, there have been no anecdotal or documented cases of work-related human illness resulting from exposure to the reassortants. This is further testimony to the attenuation of PR8 reassortants.

Genetic stability of reassortant viruses is an important issue as the wild type non pathogenic H5 and H7 avian viruses are the source of highly pathogenic viruses. Studies of a non pathogenic H5N3 reassortant between A/Goose/Hong Kong/437/99 and PR8 have shown no evidence of reversion to virulence (chickens, mice and ferrets) after 10 passages in eggs (R Webster, unpublished data).

The reassortant H5N1 viruses will be assessed and found negative for pathogenicity in the statutory chicken intravenous pathogenicity test (IVP index of 1.2 or less) and in ferrets (virus replication and clinical symptoms consistent with those induced by the attenuated parent virus [eg PR8] and distinguishable from the H5N1 avian virus infection). Tests for safety in mice may also be performed. The reassortant virus may then be distributed to vaccine manufacturers.

Ferrets have extensively been used as a good indicator of influenza virus virulence for man (reviewed by Smith and Sweet, 1988). Typically, human influenza viruses cause lethargy, nasal discharge and occasionally fever and virus replication is limited to the respiratory system. PR8 virus has been assessed in ferrets and it causes little or no clinical symptoms and virus replication is limited to the upper respiratory tract. However the 1997 Hong Kong H5N1 virus replicated throughout the body, caused fever, weight loss and occasionally death (Zitzow et al, 2002). Thus in terms of predicting a highly pathogenic human infection or an infection which is attenuated for man, the ferret is the best available model.

Potential hazards of sequences being transferred to related micro-organisms

Influenza viruses readily exchange genes by the process of reassortment. Thus there is a theoretical possibility that secondary reassortants could occur between the newly created H5N1 x PR8 reassortant and naturally occurring human or animal influenza viruses. Although it is considered that the H5N1 x PR8 reassortant will be non-infectious and attenuated for man, a secondary reassortant with a human influenza virus, may be infectious for man and pose an epidemic threat. It is generally considered to be technically difficult to produce reassortants *in vitro* and only a few laboratories in the world have success with this technique. Moreover the chance of producing reassortants between mammalian and avian viruses is

extremely slim, as was demonstrated by the lack of success in producing H5N1 reassortant vaccine in 1997 (UK, avian and swine viruses; Australia and USA, avian and PR8 viruses). When such difficulties are considered, together with the unlikely event that the laboratory containment measures would allow an H5N1 x PR8 virus to infect man and produce a secondary reassortant, the risk of such an event is low. It should also be considered that poultry and pig farmers are continually exposed to animal influenza viruses and there have been few documented cases of human infection with a reassortant between an avian and human influenza virus. The risk of such secondary reassortments for animal species will be considered in the environmental risk assessment section.

Likelihood of harm to human health

By virtue of avian receptor specificity, PR8 attenuation and loss of multi-basic amino acids at the HA connecting peptide, it is expected that the H5N1 x PR8 reassortant will not be capable of infecting man or causing harm to human health. As described above, there is a remote possibility of secondary reassortment with normal human viruses and such reassortants may be replication-competent in man, although avian receptor barriers would still act to restrict infection. In an extreme situation, such a reassortant could become well adapted to human infection and cause epidemic activity around the world.

However the likelihood of such an event is low.

Assignment of a provisional containment level

The parental PR8 virus is a hazard group 2 biological agent and the HA of the H5N1 virus will be engineered so that the rescued virus will be non pathogenic.

The provisional containment level will be Biosafety level 2+ (BSL2 with additional controls in place ie BSL2+)

Nature of the work and review of control measures to safeguard human health

Each laboratory must review its own control measures in light of the intended work and the nature of the laboratory facilities, however the following may be used as a guide:

- Ideally a BSL2+ laboratory should be maintained at an air pressure negative to the atmosphere and all virus manipulations outside sealed containers, should take place within a microbiological safety cabinet. However this may not be possible in a manufacturing environment and alternative control measures may be needed:
 - Use of other suitable barrier systems
 - Where virus manipulations on the open bench are unavoidable, staff should be protected by use of powered full-face respirators, equipped with HEPA filters.
 - Consideration should be given to

antiviral prophylaxis for staff in the production area and those in adjacent areas.

- Showering is not required, as protective clothing and hand washing procedures are normally considered adequate to protect human health and the environment for this level of hazard.
- There should be no need to inactivate effluent from hand basins and sinks, because any liquid effluent from sinks should have been disinfected by validated procedures and there is little risk of hand washing effluent posing a hazard to the environment.

A code of practice for the work should be prepared, the key features of which are:

- Procedures to prevent exposure of the H5N1 reassortant to normal human and animal influenza viruses. Staff should have received a conventional influenza vaccine to limit their susceptibility to infection with normal human viruses. If pilot lots of H5 vaccine are available, staff should receive them. There should also be an Occupational Health Policy for antiviral prophylaxis or for treatment following accidental exposure to the H5N1 reassortant virus.
- Review of all working practices to minimize the creation of aerosols from the vaccine virus.
- Procedures for the safe decontamination of waste and equipment.
- Emergency procedures (eg spillages) documented.
- Staff training programme documented.

Environmental hazards and any additional control measures necessary

Influenza viruses are capable of naturally infecting a variety of animal species (birds, pigs, horses, man, aquatic mammals, ferrets) although there are host restrictions which limit the host range of certain virus subtypes. As the H5N1 reassortant will have avian receptor specificity, birds would be the species theoretically most susceptible. What would be the contribution of PR8 internal genes to replication and virulence in birds? Brown et al (2001) demonstrated that adaptation of an influenza H3N2 virus to increased virulence in mice, could result in a variety of mutations in different virus genes. Three H3N2 mutations were in common with the virulent Hong Kong H5N1 virus and one (PA – 556) was shared with PR8 virus. Thus it could be argued that acquisition of PR8 genes may indicate increased risk for animals. However

Hatta et al (2002) has recently demonstrated by the use of reverse genetics, that acquisition of only one PR8 gene by an avian influenza virus abrogates virus replication in ducks. Based on this work, an avian virus with six internal genes of PR8 virus would not be expected to replicate in birds. Indeed experimental evidence has demonstrated that PR8 virus is attenuated in not only man (already discussed) but also chickens (Subbarao et al 2003). Furthermore a reassortant between PR8 (internal genes) and the 1997 Hong Kong H5N1 virus (NA and HA with single basic amino acid) was barely able to replicate in chickens and was not lethal. Similar studies have been performed with the 2003 Hong Kong H5N1 virus at WHO CC Memphis (R Webster, unpublished data), where the PR8 reassortant did not replicate or cause disease signs in chickens. The removal of the multi-basic amino acids from the H5 x PR8 reassortants in both studies undoubtedly played a role in reducing the risk for chickens.

It is conceivable that pigs are susceptible to infection by the H5N1 reassortant, as viruses with avian receptor specificity are known to replicate in this species. It is also possible that these species would be susceptible to secondary reassortments between the H5N1 reassortant and a pig virus. There is in fact evidence that triple reassortants between avian, pig and human influenza viruses can circulate in pigs in the USA (Webby et al, 2000).

Each laboratory to assess the risk of avian or porcine infection based on the likelihood of avian species or pigs being in the vicinity and the laboratory controls in use.

The laboratory code of practice for this work, prevents work taking place with other animal influenza viruses at the time of the reassortant work, so the risk of additional reassortment events within the laboratory is eliminated.

It is also known that mice can be experimentally infected with some influenza viruses and the PR8 strain is known to be lethal for mice. It is not known whether the H5N1 reassortant will be able to replicate in mice, but steps should be taken to prevent exposure of wild mice and escape of laboratory mice.

Each laboratory to comment on the rodent control measures in place

Therefore in summary, there are no additional measures needed to protect the environment.

Assignment of containment level

BSL2+

D. 考察

リバースジェネティクスによって弱毒化したウイルスについても、すべての項目について安全性が

検証されるまでは、BSL3レベルとして取り扱うことになっている。これは、わが国においては非常に厳しい条件であり、さらに検討を要する。さらに、実際のワクチン製造はBSL2+の条件で行うことになっている。わが国では平成10年には既にすべてのインフルエンザワクチン製造メーカーに対して資金援助を行って、これに対応可能な設備を整備しているが、さらに増産が必要となると、新たな設備の建設が必要である。

遺伝子組み換え体(GMO)としての評価は、今回の原案には入っていないが、ヨーロッパの厳しい規制条件を導入した場合には、実際のワクチン製造・供給は非常に困難な事態となろう。毎年のワクチン製造株開発に対して、欧米においては唯一認可されているPR8株を、新型ワクチン開発にも使用することは、基準の上からも実績の上からも妥当であると判断された。しかし、PR8株はヒト由来のウイルスであり、ヒトに対しては病原性はきわめて低いとしても、これを用いた遺伝子再集合体ウイルスは、ヒトに感染伝播を起こす可能性は否定できない。従って、ヒトに対してより感染伝播の可能性の低い弱毒型鳥インフルエンザウイルスに由来するウイルス株との遺伝子再集合体の方が、安全性は高いと考えられる。

わが国のインフルエンザワクチンに関する生物学的製剤基準の中で、今回のガイドラインと矛盾無く対応可能であるのか、またわが国のワクチン製造体制で、ガイドラインに沿ったワクチン製造が可能であるのかを、緊急に検討する必要がある。

E. 研究実績

1. 発表論文

J. McKimm-Breschkin, T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, M. Zambon
Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 47, 2264-2272, 2003

N. Nakajima, Y. Asahi-Ozaki, N. Nagata, Y. Sato, F. Dizon, F.J. Paladin, R. M. Olveda, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Sata
SARS corona virus-infected cells in lung detected by new in-situ hybridization technique. *Jpn. J.*

Infect. Dis. 56, 139-141, 2003

C. Kawakami, T. Saito, Y. Nakaya, S. Nakajima, T. Munemura, M. Saikusa, Y. Noguchi, K. Fujii, M. Takaoka, R. Ito, T. Saito, T. Odagiri, M. Tashiro Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 56, 110-113, 2003

2. 学会発表 なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

遺伝子操作法で作製したインフルエンザワクチンの安全性と有効性に関する研究

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：

新型インフルエンザに対応するためのヒト用ワクチン作製のため、発育鶏卵で良く増殖するバックボーンとなるウイルス株を組換え操作法を用いて作製し、その増殖性と病原性を調べた。

A. 研究目的

パンデミックインフルエンザは、HAがこれまでヒトで流行していなかったウイルスによって引き起こされる。今、日本を含むアジアで問題となっているH5N1ウイルスは、その病原性の強さのためワクチン製造に携わる人に対する健康被害が懸念される。また、現行のインフルエンザワクチンは、発育鶏卵を用いて作製するが、このウイルスは胎児を殺してしまうため、品質の高いウイルス液を得ることが出来ない。従って、このような強毒インフルエンザウイルスに対してワクチンを作成するためには、組換え遺伝子操作を用いて、ウイルスの弱毒化を行わなければならない。本研究は、この遺伝子組換え技術を用いて作製するワクチン株のバックボーンなるウイルス株の増殖性と病原性を調べることを目的とする。

B. 研究方法

組換えワクチンのバックボーンとなるウイルスとして、発育鶏卵でよく増殖するA/Puerto Rico/8/34 (H1N1)ウイルスを選んだ。リバーシ・ジェネティクス法により本ウイルスを作製するために、必要なプラスミドを、ヒト腎臓293T細胞に導入し、培養上清中のウイルスを回収した。

回収されたウイルスの発育鶏卵における増殖性

と病原性を調べた。

C. 研究結果

プラスミドを導入したヒト腎臓293T細胞の培養上清中にウイルスが検出された。得られたウイルス遺伝子の塩基配列を解析したところ、もとのウイルスと同じであることが確認された。

リバーシ・ジェネティクス法により得られたウイルスを発育鶏卵に接種し、その増殖性を調べたところ、 10^{10} plaque-forming unit/ml非常に高いタイターを示した。HA価は、4000倍以上であった。また、発育鶏卵に対する病原性も接種3日目までに死亡する胎児はなく、ほとんど病原性がないことがわかった。

D. 考察

今回人工合成したA/Puerto Rico/34 (H1N1)は、発育鶏卵で非常に良く増殖し、病原性もないことから、組換え技術を使って作製するワクチン株のバックボーンウイルスとして、理想的であることがわかった。

E. 結論

本年度の研究から、リバーシ・ジェネティクス法を用いて作製する新型ウイルス用のワクチンのバックボーンウイルスを用意することが出来た。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins. *J Virol* 77:8031-8038, 2003.

Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 21:3212-3218, 2003.

Watanabe T, Watanabe A, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* 77:10575-10583, 2003.

Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus. *J Virol* 78:1020-1025, 2004.

Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model. *Vaccine* (in press).

Horimoto H, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K,

Guan Y, Lim W5, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Tashiro M, Kawaoka Y. Antigenic Differences between H5N1 Human Influenza Viruses Isolated in 1997 and 2003. *J Vet Sci* (in press).

Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, Kawaoka Y, Horimoto T. The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor binding properties from a virulent avian influenza virus. *J Gen Virol* (in press).

Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* (in press).

Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol* (in press).

Maeda Y, Goto H, Horimoto T, Takada A, Kawaoka Y. Biological Significance of the U Residue at the -3 Position of the mRNA Sequences of Influenza A Viral Segments PB1 and NA. *Virus Res* (in press).

2. 学会発表

河岡義裕、インフルエンザウイルス、
第26回日本医学会総会(福岡)
2003年4月5日

河岡義裕、Enigmas of Influenza
Viruses&Cells(ITALY)
2003年5月19日

河岡義裕、インフルエンザウイルスの病原性、
第50回日本実験動物学会総会(埼玉)
2003年5月31日

河岡義裕、PACKAGING MECHANISM OF INFLUENZA VIRAL RNA、Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日

堀本泰介、高田礼人、堀本研子、五藤秀男、河岡義裕、GENERATION OF INFLUENZA A VIRUSES WITH CHIMERIC(TYPE A/B)HEMAGGLUTININS、Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日

五藤秀男、河岡義裕、ADDITIONAL PROCESSES EXIST THAT AFFECT HA CLEAVAGE BY A PLASMINOGEN-ACTIVATING NA、Negative Strand Viruses 2003(ITALY) 2003年6月15日

堀本研子、河岡義裕、堀本泰介、DIFFERENCE IN RECEPTOR BINDING BETWEEN THE INDEX H5N1 HUMAN ISOLATE FROM 1997 AND A VIRULENT AVIAN INFLUENZA VIRUS、Negative Strand Viruses 2003(ITALY) 2003年6月15日

野田岳志、相良洋、喜田宏、河岡義裕 CLOSE-UP OF INFLUENZA A VIRUS RNPS、 Negative Strand Viruses 2003(ITALY) 2003年6月15日

河岡義裕、インフルエンザ最近の知見、第10回ヘルペス感染症フォーラム(東京) 2003年8月23日

五藤秀男、河岡義裕、A LOSS OF THE OLIGOSACCHARIDE CHAIN IN THE NA IS NOT A DEFINITIVE FACTOR FOR PLASMINOGEN-MEDIATED HA CLEAVAGE. 2nd Orthomyxoviruses Research Conference(U.S.A.) 2003年8月21日

堀本泰介、高田礼人、堀本研子、八田正

人、五藤秀男、河岡義裕 GENERATION OF INFLUENZA A VIRUSES WITH CHIMERIC(TYPE A/B)HEMAGGLUTININS、 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム(兵庫)、2003年8月27日

堀本泰介、高田礼人、堀本研子、八田正人、五藤秀男、河岡義裕 Potential for use of influenza A viruses with chimeric(type A/B)hemagglutinins as vaccines. Options for the Control of Influenza V(沖縄)、2003年10月10日

高田礼人、松下幸子、二宮愛、河岡義裕 喜田宏 Intranasal Immunization with Formalin-Inactivated Virus Vaccine Induces A Broad Spectrum of Heterosubtypic Immunity Against Influenza Virus Infection in Mice. Options for the Control of Influenza V(沖縄)、2003年10月10日

堀本泰介、堀本研子、藤井健、渡辺登喜子、藤井豊、河岡義裕 9本鎖インフルエンザウイルスベクター、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日

五藤秀男、河岡義裕 A型インフルエンザノイラミニダーゼの新規機能に関する研究、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日

村本裕紀子、高田礼人、藤井健、堀本研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕 インフルエンザウイルスPB2遺伝子分節のパッケージングと粒子形成に及ぼす影響、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会

(京都)、2003年10月28日

なし

藤井健、高田礼人、堀本泰介、五藤秀男、堀本研子、伊藤睦美、前田寧子、八田正人、渡辺真治、伊藤啓史、伊藤壽啓、二宮愛、今井正樹、西藤岳彦、板村繁之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕

2003年にヒトから分離されたH5N1インフルエンザウイルスの弱毒改変型HAをもつ組換えワクチン候補株の作出、
第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日

河岡義裕、インフルエンザウイルス核蛋白質複合体の構造、第26回日本分子生物学会年会(神戸)2003年12月11日

堀本研子、堀本泰介、藤井豊、河岡義裕
A型インフルエンザウイルスNS2(NEP)蛋白質のNES配列の機能解析、第2回感染症若手研究者沖縄フォーラム(沖縄)2004年2月12日

村本裕紀子、高田礼人、藤井健、野田岳志、堀本研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕、A型インフルエンザウイルスPB2、PB1およびPA遺伝子分節のパッケージングと粒子形成への関与、第2回感染症若手研究者沖縄フォーラム(沖縄)2004年2月12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

リバーシジェネティクス技術を用いて作製した弱毒化 H5N1 ウイルスの安全性に関する研究

分担研究者：今井 正樹（国立感染症研究所ウイルス第三部第一室研究員）

共同研究者：喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科教授）

研究要旨 リバーシジェネティクス技術により弱毒化した組み換え H5N1 インフルエンザウイルスの病原性を確認するため、ウイルスのニワトリに対する病原性試験ならびにトリプシン依存性増殖試験を行った。その結果、組み換えウイルスはニワトリに対して強い病原性を示さず、トリプシンに依存して増殖することがわかった。従って、このウイルスはニワトリに対して十分に弱毒化されていることが確認された。今後、このウイルスのヒトへの安全性を検証する必要がある。

A. 研究目的

2003年2月に香港でトリの強毒型 H5N1 インフルエンザウイルスがヒトに感染し、1名が死亡した。そのため、このウイルスに対するワクチン開発は緊急の課題である。

トリの H5 ウイルスには、ニワトリや七面鳥に全身感染を引き起こす強毒株や呼吸器や腸管などの限定された組織でのみ増殖する弱毒株が存在する。強毒株と弱毒株との病原性の差を規定している要因の一つは、蛋白分解酵素による HA の開裂活性化の差に依存することが明らかになっている。すなわち、強毒株は全身臓器に存在する酵素で HA が開裂活性化を受け、その結果、致死的な全身感染を引き起こすが、弱毒株は呼吸器や腸管に局在するトリプシン様酵素でのみ活性化されることから、呼吸器や腸管の局所感染に終始する。

上述したように弱毒株のニワトリにおける感染は致死性を示さない。また、弱毒株はトリプシン様酵素が存在する条件でしか増殖できないことから、ウイルスのトリプシン依存性増殖がトリインフルエンザウイルスの病原性の指標としてよく用いられている。本研究では、リバーシジェネティクス（RG）遺伝子操作技術を用いて弱毒化したワクチン候補株の病原性を確認するためにウイルスのニワトリに対する病原性試験ならびにトリプシン依存性増殖試験を行った。

B. 研究方法

（1）H5N1 組み換えウイルスの作製

発育鶏卵で高増殖する A/PR/8/34（H1N1）（PR8）ウイルスの 8 種類（PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、M、NS）の RNA(vRNA)とヌクレオキャプシド(vRNP)を構成する 4 種類の蛋白（PB1、PB2、PA、NP）を発現するプラスミドを作製し、これらを細胞に導入して、感染性ウイルス粒子を回収した。同様に、A/Hong Kong/213/03（H5N1）（強毒型 HK213）ウイルスの HA の開裂部位を弱毒型に改変した遺伝子と NA 遺伝子を作製し、HK213 ウイルス（弱毒型 HA、NA）と PR8 ウイルス（PB1、PB2、PA、NP、M、NS）とのリアソータントウイルス（H5N1 組み換えウイルス）の回収を試みた。

（2）ウイルスのニワトリに対する病原性試験

1) Mean death time at minimum lethal dose (MDT/MLD): ウイルスを 10 倍段階希釈し (10^{-3} ~ 10^{-9})、各希釈を 3 個ずつの 9 日卵齢鶏胚の尿膜腔内に 0.1ml 接種し、8 時間ごとに 5 日間観察した。MDT 値は全ての鶏胚が死亡する最高希釈のところで決定した。

2) Intracerebral pathogenicity index (ICPI): 1 日齢のニワトリ（品種：白色レグホン）10 羽の脳内にウイルス感染鶏胚尿液 $10^{5.5}$ EID₅₀/ml を 0.1ml 接種し、8 日間観察した。スコア（0, normal; 1, sick; 2, dead）の合計を観察したニワトリ数で割った（最大指数 2.00=全ニワトリが 24 時間以内に死亡、0.00=8 日間いずれのニワトリも臨床症状を示さない