200400039A

厚生労働科学研究費補助金

特 別 研 究 事 業

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

平成16年度　総括・分担研究報告書

主任研究者

谷 口 清 州

平成17(2005)年4月

厚生労働科学研究費補助金

特　別　研　究　事　業

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

平成16年度　総括・分担研究報告書

主任研究者

谷　口　清　州

平成17(2005)年4月

別添2

目　次

I.　総括研究報告
高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究
谷口清州-- 1

II.　分担研究報告
1)　ベトナムにおける高病原性トリインフルエンザ感染症の疫学状況
谷口清州、田中政宏、他-- 13
2)　高病原性トリインフルエンザウイルス対策の臨床的調査研究
川名明彦、工藤宏一郎-- 23
3)　高病原性トリインフルエンザ診断系の改良と海外流行地への診断技術支援
小田切孝人、小渕正次、他-- 26
4)　ベトナム・ホーチミン市およびハノイ市における高病原性トリ型インフルエンザ
実験室診断技術支援派遣
西藤岳彦-- 30
5)　高病原性トリインフルエンザウイルスのネコに関する調査研究
山田章雄-- 33
6)　トリインフルエンザの流行がみられた地域におけるクロバエ類の調査
小林睦生-- 36
7)　トリインフルエンザ流行地で採集されたクロバエ類からのインフルエンザウイルスの検出
小林睦生-- 45
8)　H5N1型インフルエンザワクチンの試験製造と非臨床試験および
流行ウイルスの変異に対する監視に関する研究
田代眞人-- 52
9)　高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究
東　雍-- 56
10)　高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究
城野洋一郎-- 60
11)　高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究
駒瀬勝啓-- 63
12)　新型インフルエンザワクチンの品質管理に係わる調査研究
板村繁之、篠原克明-- 65

III.　研究成果の刊行に関する一覧表--------------------------------------- 77
IV.　研究成果の刊行物・別刷-- 81

Ⅰ．総括研究報告

平成16年度厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)
総括研究報告書

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究

主任研究者 谷口 清州 国立感染症研究所 感染症情報センター第一室長

研究要旨
2003年11月より2005年3月の現在に至るまで、アジア各国においてH5N1亜型の高病原性トリインフルエンザウイルスによる家禽におけるアウトブレイクとヒトにおける感染事例が発生している。トリインフルエンザのヒトにおける感染では高い死亡率を示し、またウイルスの変異によるパンデミックへの進展が危惧されている。本研究班では、これまでの高病原性トリインフルエンザの知見を整理し、発生国での現状を調査することにより最新の情報を把握するとともに、今後の連携体制について検討した。またイエネコとクロバエ類の調査から、これらの感染伝播における役割を検討した。そして今後の新型インフルエンザウイルス出現に備えて、ワクチンを試作した。
ベトナム、カンボジアでは依然としてヒトでの感染事例が続いていることから、継続的な情報収集と疫学的、臨床的な研究を促進していく必要があり、特に発生国でのサーベイランスの強化あるいは患者の早期発見、そして検査室診断の支援は発生国のひいては世界における対策につながっていくものである。またトリにおける発生拡大の予防は、ヒトへの感染の予防そしてパンデミックの予防にもつながるものであり、この意味から高病原性トリインフルエンザウイルスの感染伝播のメカニズムを追求していくことは今後の対策に不可欠である。そして最終的にパンデミックに備えて、ワクチンの開発を進めておくことは危機管理上極めて重要であることは言うまでもない。

分担研究者
山田 章雄　国立感染症研究所獣医科学部
小林 睦生　国立感染症研究所昆虫医科学部
田代 眞人　国立感染症研究所ウイルス第3部
小田切孝人　国立感染症研究所ウイルス第3部
佐藤 征也　(株)デンカ生研ウイルス学
水野 喬介　(財)化学及び血清療法研究所ウイルス学
東 雍　阪大微生物病研究会予防医学・ウイルス学
駒瀬 勝啓　(社)北里研究所ウイルス学
小渕 正次　国立感染症研究所ウイルス第3部
今井 正樹　国立感染症研究所ウイルス第3部
板村 繁之　国立感染症研究所ウイルス第3部

西藤 岳彦　国立感染症研究所ウイルス第3部
二宮 愛　国立感染症研究所ウイルス第3部
篠原 克明　国立感染症研究所バイオセーフティ管理室
大日 康史　国立感染症研究所感染症情報センター
重松 美加　国立感染症研究所感染症情報センター
ポール橘谷　国立感染症研究所感染症情報センター
中島 一敏　国立感染症研究所感染症情報センター
田中 政宏　国立感染症研究所感染症情報センター
上野 正裕　国立感染症研究所感染症情報センター
工藤宏一郎　国立国際医療センター国際疾病センター
川名 明彦　国立国際医療センター呼吸器科

A. 研究目的

2003 年 11 月からアジアを中心に、高病原性トリインフルエンザ(Highly Pathogenic Avian Influenza; HPAI)の H5N1 亜型による多くの家禽におけるアウトブレイクが発生しており、2005 年 3 月現在ベトナムおよびカンボジアでは、依然として流行が続いている。これまでのところ 79 例のヒトにおける感染患者が報告されており、そのうち 49 例が死亡している。本邦でも、山口県、大分県、京都府において家禽における発生が認められたが、幸いにもヒトにおける感染は認められなかった。しかしながら、交通と流通のグローバル化、あるいはまだ知られていないメカニズムによって、本邦にて再び HPAI が流行する危険性は依然存在している。家禽での感染に伴う社会への影響は極めて大きいが、のみならず、これまでのところヒトに感染した場合、非常に高い死亡率が報告されており、ヒトへの感染防止対策を行うことと、万が一それらが発生した場合にパンデミックへの進展を予防するためにも、十分な準備が必要である。

本研究班では、HPAI のヒトでの感染が蔓延することを防止するために、1)ヒトにおける感染の臨床・疫学状況と感染の危険度についてより最新の情報を収集することにより、本邦における対策に反映させること、2) Proactive な対応のために、ネコおよびクロバエの感染伝播への関与を検討することによって伝播ルートの解明につなげること、そして4) 効果的なワクチンの開発のための基礎的検討を行い、実用化にむけての品質管理を検討することを目的とする。

これらは、基本的に我が国において HPAI が再発した場合に、効果的なサーベイランスにより早期にヒトでの感染を探知し、患者さんへよりよい治療と管理を提供し、院内における感染拡大を防止し、一般社会における拡大を防止することを目標としているが、これらについての研究を促進することにより HPAI に関する知見を集約し、現在発生の見られているアジアの国々に対して技術的支援をも行うことにより、それらの国々での拡大を防止し、国際的な感染症対策に貢献することも大きな目的の一つである。もちろん、トリインフルエンザの拡大を未然に防ぐことは容易なことではなく、将来起こりうると考えられるパンデミックを見据えて、パ

ンデミックプランを促進することと、それらに対する事前準備としてのワクチンの開発はこれらの帰結するところである。これらの成果は、国民の健康と社会機能維持に対する新型インフルエンザによる健康危機への事前準備に直接貢献するものである。

B. 研究方法

疫学状況の調査については、これまで報告されているHPAIに関する臨床、疫学に関する文書を収集評価するとともに、ヒトでの感染の発生国との協力により、現地調査により事実を再確認するとともに、行われてきた実際の対策と経験を共有する。また、対策担当者とこれまでに判明していること、未だ不明のことについて議論を行い、今後の対策方針を検討するとともに、当該国と我が国における協力連携体制について協議を行う。

ネコにおける調査では、京都府浅田農産船井農場周辺の(30km 内外)獣医師に近在の飼い猫からの採血を依頼し、血清分離の後 H5 亜型ウイルスを抗原とする赤血球凝集抑制試験で、ウイルスに対する抗体の有無を検索する。陽性個体については中和試験を行い確認する。ネコ由来細胞(株化細胞、初代培養)をa2-3 結合型シアル酸を認識する Sambucus nigra agglutinin あるいは a2-6 結合型シアル酸を認識する Maackia amurensis agglutin で染色し、ネコ細胞におけるレセプター分布を明らかにすると同時にこれらの細胞におけるウイルス増殖を検討する。ネコから器官、肺、腸管などを採取し、これらの器官の上皮細胞に 2-3、および 2-6 結合型シアル酸 を有するレセプターが存在するかどうか及びその分布を上記レクチンを用いて検討する。

クロバエに関する研究では、1)オオクロバエの移動・分散に関して、昨年トリインフルエンザの流行が確認された山口県阿武郡阿東町と京都府船井郡丹波町の2ヶ所を調査地として以下の野外調査を実施する。オオクロバエが飛来する時期の前後に野外調査を実施し室内実験用のサンプルを採取する。また、飛来した個体が定着し繁殖を開始すると思われる 12 月はじめに、標識再捕獲法を用いて移動分散範囲と生息個体数の推定を行う。さらに新成虫の羽化がはじまる 3 月頃に採集を行って親世代の生残状況を調査する。2)オオクロバエへのウイルス実験感染による病原体動態解析としては、室内系統のオオクロバエ成虫に低病原性インフルエンザウイルス(A/H3 亜型)を一定時間摂食させ感染クロバエを作成する。ウイルスを取り込んだクロバエを継時的に解剖し、そ嚢・腸管・排泄物ごとにウイルス乳剤を作成する。MDCK 培養細胞によるウイルス量の測定と、RT-PCR によるウイルスRNA の検出によって、ハエ体内でのウイルス量の変化を継時的に追跡する。同時に各処理毎の免疫組織切片からハエ体内でのウイルス動態を解析する。3)鶏舎周辺に発生するハエ類の殺虫剤抵抗性を解析するため、オオクロバエ成虫を山口県下、京都府下の養鶏場周辺で捕集し、それらを用いてハエ成虫駆除用殺虫剤の有効成分の局所施用法による殺虫試験を行う。また、イエバエの殺虫剤感受性系統や文献上の同種野外コロニーが示した感受性と比較し、殺虫剤による防除の有効性を確かめる。

効果的なワクチンの開発のために、1)H5N1 ウイルス感染疫学、多様性を解析し、新型ワクチンの設計を行う。種々の分離ウイルスを検討するために、ベトナム・タイの現地調査をする。2)H5N1 型ワクチンの緊急開発とアルミアジュ

バントの効果を小動物を用いて検討する。これらの成果を踏まえて、3) H5N1 ワクチンの試験製造を行うとともに、4) 新型ワクチン実用化を念頭に、製造過程におけるバイオセフティーおよび GMP による品質管理基準を検討する。全ての過程は、臨床試験の実施および製造承認の取得を目的とし、厳密に GMP、GCP に準拠した施設・方法で行われる。新型ワクチン製造株の開発製造については、NIBRG-14 株について、国内のワクチンメーカーに委託して国内マスターシード候補株を作製する。その各々について、感染研において遺伝子塩基配列、弱毒性、抗原性、増殖性およびそれらの安定性を検証し、国内マスターシードを決定する。その後、各メーカーに国内マスターシードを分与し、不活化全粒子ワクチンの試験製造を、GMP および BSL2+に準拠した製造ラインによって行う。これに、アルミアジュバント(国内で統一した規格)を添加し、最終製品を完成させる。そして、各試験ワクチンについて、現行の生物学的製剤基準および WHO 基準に基づいて、品質管理試験を行う。また、試験ワクチンの基礎試験として、製造承認取得のために必要とされる試験成績の作製およびワクチンとしての的確性を可能な限り広い範囲で検証するとともに、GLP を満たす施設において、試験ワクチンの非臨床試験を行う。最終的に、臨床第一相+第二相試験の試験計画の策定を行う。また品質管理方法、検定基準、標準品について、国際的な整合性を図るために、英国国立生物製剤標準管理研究所に出張する。

倫理面への配慮

疫学調査に当たっては、相手国の方針に従い、基本的に個人情報は取り扱わない。ネコからの採血は獣医師から畜主へ十分な説明を行った後に行う。ネコからの臓器の採取に当たっては、国立感染症研究所動物実験委員会に諮り、承認を得た後に行う。

ワクチンの試験製造に関しては、BSL2+の製造施設内において、BSL3 に準拠した安全対策を講じて、従業員の暴露感染の防止には十分に配慮する。また施設外への汚染事故を防止するためのモニターも行う。これらについては、各施設ごとに基準と実施要領、SOP を作り、その徹底を図る。特に、従業員等の関係者に対しては、作業前および作業過程において健康診断と採血、抗体測定を行い、異常が報告された際には、作業を凍結して適切な対策を講ずることとする。前臨床試験の計画、実施に際しては、動物愛護の原則を守り、不要な動物実験は行わず、必要最小限度の犠牲に留める。また動物に苦痛を与えないような方策をとる。臨床試験の計画については、倫理委員会における審議結果に従うが、十分なインフォームド・コンセントの下に、安全性を十分に確保して、GCP に準拠して行うように、計画を策定する。

C. 研究結果

高病原性鳥インフルエンザ(以下 HPAI)は 2003 年から 2004 年にかけて本邦を含む世界各地の家禽の間で発生し、タイ、ベトナム、オランダなどでヒトへの感染が認められており、これらウイルスがヒト-ヒト感染の能力を獲得してパンデミックへと進むのを防止する上でも、その対策は火急の課題である。しかしながら、これまで香港、オランダ、タイ、ベトナムにおいて精力的な研究が行われてきたにもかかわらず、未だ不明な部分が非常に多く、各国は手探りでの対策を行っている状況である。本研究班

では、特にヒトへの感染の防止と、国民の安全を守るために、ヒト感染における疫学、伝播ルート解明のための媒介動物におけるウイルスの動態、そして感染予防としてのワクチンの開発の三つの分野で研究を行った。

ヒト感染における疫学状況は、これまで多くのヒトにおける感染が認められた、香港、オランダ、ベトナム、タイで詳細な報告が行われており、世界保健機関はこれらの情報をもとにガイドラインを策定しており、本邦においてもそれらを参考にしてガイドラインを作製した。しかしながら依然として、鳥からヒトへの感染の効率や診断の感度、治療の有効性など不明な部分も多いため、これまでの報告をレビューするとともに、ベトナムに臨床医と疫学者、ウイルス学研究者を派遣して、情報収集を行い、対策に従事したヒトとの議論を行った。

疫学的な面から、実際の現地でのサーベイランスとトリインフルエンザの患者の早期把握のための積極的症例探知の方法を調査し、現地では最大限の努力が払われていることがよく理解できたが、その反面、インフラの不足から、軽症例はほとんど見逃されており、また重症者であっても、サンプルを経時的に採取しているわけでもなく、またいろいろな部位から採取しているわけでもなく、もちろん RT-PCR の感度と特異度もいまだ判明していないことから、重症例もすべて把握されているわけでもないことが判明した。これらはベトナム側の研究者も把握しているところであり、今後の研究協力を行っていくことを合意することができた。

また臨床面では、ヒトにおける鳥インフルエンザ A(H5N1)の臨床像、治療効果ならびに感染対策の現状を知るため、ベトナムの病院で調査を行った。本疾患は現在も同国で流行中である。感染者は重症化しやすく致死率は高い。治療薬としてタミフルが用いられるが、同国の治療開始の時期は一般に遅く、早期診断早期治療の体制を確立する必要がある。有効な感染対策も重要である。本疾患に対する今後の対策のためには、日本とベトナム両国の連携による臨床研修、臨床研究の推進が重要であることを再確認した。

上述のごとく、診断体制を確立することは極めて重要であるが、診断に関する研究グループでは、現行の RT-PCR 法を one-step から two-step 法へ変更することにより、PCR の診断感度を向上させることに成功した。また、高感度で迅速に遺伝子検出が可能なH5-LAMPキットの開発と実用化に成功した。これら新技法を駆使して東南アジア諸国などから検査依頼された臨床検体について感染診断を行った。また、2005 年 1 月からのベトナム北部、南部でにおけるヒト感染の再発に伴い、H5N1 ウイルスの流行地への国際貢献として、ベトナムへ研究員を派遣し、ホーチミン市のパスツール研究所において技術指導と検査系の精度管理の指導を行い、診断系の改良を行った。また、ハノイ市 National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) では米国 CDC と共同で、WHO の依頼に基づき診断技術に関するワークショップを行った。

また、媒介動物に関する研究では、イエネコが高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)ウイルスの自然界における存続や伝播にかかわる可能性を検討するために、国内でHPAIが発生した養鶏場地域で飼養されていた成猫の血清採取と H5 亜型インフルエンザウイルスに対する血清抗体の検出を試みた。採取できた推定年齢1歳以上の成猫の血清 24 検体では、赤血球凝集阻止(HI)試験で明らかな陽性を示すものはなかった。しかし、非特異的血球凝集阻

止因子の除去が不十分と思われる反応を示す検体がありネコ血清における HI 試験のための条件検討が必要となった。また、ネコが本ウイルスにどのように感受性であるかを検討するためにネコ由来細胞におけるウイルスレセプターの解析およびウイルス増殖についても検討する必要があると考えられた。

また、鳥インフルエンザの流行が確認された山口県阿東町と京都府丹波町で、クロバエ類の現地調査を行ったところ、オオクロバエが高密度で生息していることが確認できた。また同時にオオクロバエは長距離移動を行っていることも確認され、オオクロバエの摂食活動を通してトリインフルエンザウイルスなどの病原体を保持する可能性が高いと考えられた。一方、京都府丹波町でのトリインフルエンザの流行時にクロバエを中心とするハエ類を鶏舎付近で採集し、そ嚢および消化管からインフルエンザウイルスの検出と分離を試みたところ、オオクロバエとケブカクロバエの各 20 匹の消化管ホモジェネートから高病原性 A/H5 亜型のインフルエンザウイルスが検出された。個体別にウイルスの検出を行ったところ、上記 2 種のクロバエにおけるウイルス RNA の検出率は 10～30%で、発生鶏舎より約 2km 地点で採取されたオオクロバエの10%がウイルス陽性であった。分離されたウイルス株の遺伝子 3 分節の全塩基配列から、本ウイルスが A 型 H5N1 亜型のインフルエンザウイルスであることが確認され、アウトブレイク由来の分離株との塩基相同性からほぼ同一のウイルスであると見なされた。これらから、クロバエ類がウイルスを保持する能力のあることが確認され、ウイルスの伝播になんらかの関与がある可能性が示唆された。

H5N1 高病原性鳥インフルエンザが東アジアで広く流行中の現状から、近く新型インフルエンザが出現して大流行を起こすことが懸念されており、これに備えて、新型ワクチンの緊急開発・増産体制の確立がWHOを中心として進められている。我々は、高病原性ウイルスを遺伝子操作によって弱毒化し、ワクチン製造用の種ウイルスを開発する技術を確立した。しかし、この技術を用いて作製した 1997 年および 2003 年に香港で流行した H5N1 ウイルスに対する試作ワクチンは、臨床第1相試験の結果、人に対する免疫原性は低く、現行のワクチン製剤では H5N1 亜型インフルエンザには対応できない可能性が示された。これに対しては、アルミアジュバントを添加した不活化全粒子ワクチン製剤の開発が現実的な解決方法である。2004 年ベトナムの患者から分離された H5N1 型ウイルスを基に、WHO 基準に基づいた弱毒化ウイルスを作製した。

まず、2004 年にヒトから分離された A/Viet Nam/1194/2004(H5N1)株をリバースジェネティクス法(以下 RG 法とする)にて弱毒化した NIBRG-14 株(英国 NIBSC より分与)を使用し、分担研究者である4所社((財)化学及血清療法研究所、(財)阪大微生物病研究会、(社)北里研究所、デンカ生研(株))中、3所社にて各所社共通の計画書のもとマスターシード候補を作製した。マスターシード中、(社)北里研究所のマスターシード候補が各所社共通のマスターシードとして選択された。これをもとに、各所社共通の計画書のもと、試作ワクチン原液を製造した。結果的には、ウイルスの増殖性が悪く、卵 1 個あたりの抗原出来高を現行ワクチンと比較すると、1/5～1/10 程度であり、今後も種株の選択、あるいは MS の作製法等に検討が必要と考えられた。また、試作ワクチン原液の品質管理試験を行い、小分製品作製の準備を行い、製剤化の検討として、2 種類の

アルミアジュバントを用いた検討を行い、アジュバントの選択を行った。非臨床試験の試験項目を検討し、GLP 施設へ試験を委託した。

一方、インフルエンザウイルスは頻繁に抗原変異を起こすので、常に流行ウイルスの性状をモニターし、抗原変異が生じている際には、ワクチン株を変更することが必要となる。そこで、現在 H5N1 型の流行が拡大しているベトナムにおける流行ウイルスの抗原性および遺伝子変異を継続して監視するために、ホーチミン市のパスツール研究所と共同研究契約を結び、インフルエンザ様患者からの検体採取、H5N1 型ウイルスの遺伝子診断、ウイルス分離用検体の収集を委託した。現地でのスクリーニングで陽性のもの、不確定のものについては、ウイルス分離と詳細な性状解析のための共同作業を行った。その結果、2005 年 3 月現在、ベトナムで流行中のウイルスの性状には大きな変化はなく、現在開発中のワクチンの製造株を変更する必要は無いと判断された。

D. 考察

2005 年 3 月現在、タイでは新たなヒトでの感染例はみつかっていないものの、ベトナム、カンボジアでは依然としてヒトでの感染例が存在する。トリからヒトへ、あるいは効率が悪いながらもヒトからヒトへの感染が起こっていれば、ウイルスが変化する可能性が存在し、パンデミックへの進展の危険性も増大する。今回の研究により得られた結果から、トリインフルエンザについては、疫学上も臨床上も、またウイルス学的にもまだまだ不明な点が多く、更なる研究が必要なことは明らかである。

今回のベトナムでの現地研究者との議論において、ベトナムにおけるトリインフルエンザの状況について多くの情報を得ることができた。これらについては、我が国における研究者や、また、特に厚生労働省の関係部局との情報共有により、今後の我が国におけるトリインフルエンザ対策に活かしていくことが期待される。また、ベトナムでもタイでも、WHO の勧告を基本とした詳細なトリインフルエンザに関するサーベイランスあるいは患者管理のガイドラインを策定しており、ベトナムには英語版はないが、タイでは英語版も作製されており、これらは我が国にとっても有用である。また、現状のベトナムにおけるサーベイランスの問題点についても多数指摘され、今後の研究協力についても前向きの議論が行われた。ベトナムにおけるサーベイランスと対策の改善は、すなわち世界における対策とともに我が国における対策につながるものであり、今後、軽症患者の早期把握における研究協力やベトナムにおける定点サーベイランスの改善に関して、協力を行っていくことが期待される。ベトナムとわが国との診療、研究レベルでの協力に関し同国は好意的であり、両国の今後の感染対策のためにも具体的な連携が重要である。臨床面では、具体的にはベトナムに臨床研修ならびに研究の拠点を設置し、両国の感染対策に裨益する活動を展開することが考えられている。ホーチミン市立熱帯病病院と英国オックスフォード大学との連携は、今後のわが国との連携構築に当たり検討すべきモデルと思われる。

診断面では、H5 遺伝子検出診断の感度改善策として RT-PCR 法の改良と、特殊な検出機材がなくても単純な恒温槽があれば H5 遺伝子を 35 分以内に検出できる H5-LAMP 法を開発し、2004 年末の実用化に成功した。本研究成果は今後の H5 ウイルスの感染診断に大きく貢献することが期待される。一方、流行発

生当事国では現有の設備の不具合や担当スタッフの知識、経験不足から来る診断精度の低さなどハード面とソフト面いずれにおいても適切な診断を行うのは難しい状況にある。今回、感染研から研究員を派遣し、検査精度改善を試み、一定の成果を挙げることができた。しかし、今後も H5N1 鳥インフルエンザの流行が続くことが予想されることから、今後も継続した技術支援が必要である。特に、パスツール研究所では、施設、設備が未だ十分ではなく今後の支援、共同研究をとおして充実させていく必要性が感じられたが、一方、NIHE は施設面では十分整備されており、今後ウイルスサーベイランスの経験を持つ人材の養成が必要であると考えられた。

イエネコが高病原性鳥インフルエンザウイルスの自然界における存続や伝播にかかわる可能性を検討するために、国内で本疾患が発生した養鶏場地域で飼養されていた成猫の血清を収集し、H5 亜型インフルエンザウイルスに対する血清抗体の検出を試みたが、採取できた推定年齢1歳以上の成猫の血清 24 検体では、HI 試験で明らかな陽性を示すものはなかった。しかし、非特異的血球凝集阻止因子の除去が不十分と思われる反応を示す検体がありネコ血清における HI 試験のための条件検討が必要と考えられた。また、ネコが本ウイルスにどのように感受性であるかを検討するためにネコ由来細胞におけるウイルスレセプターの解析およびウイルス増殖についてもあわせて検討する必要があると考えられた。

今回のクロバエ類のフィールド調査により、クロバエ類がトリインフルエンザの発生地に高密度に分布し、またインフルエンザウイルスを保持していたことが判明したが、これらの結果だけでは、クロバエ類が我が国におけるトリインフルエンザの流行にどのように関与していたかを判断するのには十分ではない。今後、クロバエ体内でのインフルエンザウイルスの動態や感染伝播能、あるいは飛翔範囲やクロバエと鶏との摂食などについて、更に検討をする必要がある。

H5N1 型高病原性鳥インフルエンザの流行拡大によって、新型インフルエンザの出現が危惧されており、WHO をはじめ、世界各国で、ワクチンの緊急開発が叫ばれているが、世界中で新型ワクチンの製造承認を目的とした試験製造と臨床試験の実施計画は、米国が 2 社に依頼したのみであり、我が国における、アジュバントを添加した H5N1 ワクチンに対する試験製造と臨床試験の計画は、WHO をはじめ多くの国が注目している。日本の開発計画では、アジュバントを用いることで免疫原性を高めるとともに、抗原量を1/10 にまで節約することが予想されるので、国内のみならず、海外へもより多くの人にワクチンを提供できることが期待される。さらに、国の計画として、国内全メーカーが参加し、全ての成績を共有するという緊急開発体制は現状では世界で我が国だけである。今回はモックアップワクチン用原液を製造する事を主な目的とし、概ねその目的を達成できた。今後、製剤化の検討を行い、ワクチンの有効性、安全性、安定性等を基礎試験、非臨床試験、臨床試験を通して検証してゆく必要がある。一方、今回の研究結果では、シードウイルスの増殖性は、期待されたよりも若干低い結果であった。有効で安全なワクチンを安定的に製造するためにも、今後もシードウイルスについての増殖性や継代による影響を検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

現状では、東南アジア諸国における高病原性H5N1鳥インフルエンザの流行は依然として続いているし、我が国でも再び流行が起こる可能性がある。ヒトにおける感染に対して十分な準備を行うとともに、来るべきパンデミックに対する備えも怠りなく進める必要がある。このためには、以下の課題について今後も進めていく必要がある。

(1)現行のトリインフルエンザに対する知識を集約するとともに、発生国と効果的な連携体制をとり、最新の情報を継続的に収集し、技術的な支援と研究協力により、発生国の対策ひいては世界における対策に貢献していくこと。

(2)イエネコでは感染の証拠は確認されず、オオクロバエではウイルスを保持している可能性が示唆されたが、これらは感染の伝播を考える上で重要な課題であり、今後更なる研究を行っていくこと。

(3)新型インフルエンザウイルス出現に備えて、アルミアジュバント添加不活化全粒子ワクチンの試験製造を行ったが、今後これらの実用化に向けて、更なる検討を行っていくこと。

F. 健康危険情報

新型インフルエンザに対するワクチン開発が進められたが、緊急危機対応の面から、臨床試験および承認審査の優先的な実施と短縮化、簡素化が強く望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahiko Saito, Yoko Nakaya, Takashi Suzuki, Reiko Ito, Toshinori Saito, Hiroyuki Saito, Shinichi Takao, Keiji Sahara, Takato Odagiri, Takeomi Murata, Taiichi Usui, Yasuo Suzuki and Masato Tashiro Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. J. Med. Virol. 74, 336-343 (2004).

2) Masaki Imai, Shinji Watanabe, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi and Takato Odagiri Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. J. Virol. 78, 11007-11015 (2004).

3) Naomi Takasuka, Hideki Fujii, Yoshimasa Takahashi, Masataka Kasai, Shigeru Morikawa, Shigeyuki Itamura, Koji Ishii, Msahiro Sakaguchi, Kazuo Ohnishi, Masamichi Ohshima, Shu-ichi Hashimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hiroshi Yoshikura, Toshinori Takemori, Tasuko Tsunetsugu- Yokota A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. International Immunol. 16, 1423-1430 (2004).

4) Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T Antibodies to Human-Related H3

Influenza A Virus in Baikal Seals (Phoca sibirica) and Ringed Seals (Phoca hispida) in Russia. Microbiol Immunol 48:905-909. 2004

5) 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、田代眞人 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)

6) 小田切孝人 東アジア諸国で大流行している高病原性トリインフルエンザウイルス。小児科、45、434-439 (2004)

7) 川名明彦. ヒトにおける鳥インフルエンザ A(H5N1)感染症の臨床. 呼吸. Vol.23, No.9, p704-710, 2004

8) 川名明彦. 入門講座 ヒトの鳥インフルエンザ H5N1 感染症. 感染と消毒. Vol.11, No.2, p95-100, 2004

9) 川名明彦. ヒトの鳥インフルエンザウイルス感染症の臨床. 臨床とウイルス(印刷中)

10) 谷口清州. 高病原性トリ型インフルエンザ. 感染症 朝倉書店 111-115 2004年9月.

11) Tran Tinh Hien, Nguyen Thanh Liem, Nguyen Thi Dung, Luong Thi San, Pham Phuong Mai, Nguyen van Vinh Chau, Pham Thi Suu, Vo Cong Dong, Le Thi Quynh Mai, Ngo Thi Thi, Dao Bach Khoa, Le Phuc Phat, Nguyen Thanh Truong, Hoang Thuy Long, Le Truong Giang, Nguyen Dac Tho, Nguyen Thi Kim Tien, Le Hoang San, Le Van Tuan, Christiane Dolecek, Tran Tan Thanh, Menno de Jong, Constance Schultsz, Peter Cheng, Wilina Lim, Peter Horby, the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (N.Bhat, P.Brudon, P.Calain, A.Curns, R.Doran, K.Fukuda, T.Grein, P.Horby, S.Itamura, N.Miranda, T.Uyeki), and Jeremy Farrar. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N.Engl.J.Med. 350: 1179-1188 (2004)

12) Iwasaki T, Itamura S, Nishimura H, Sato Y, Tashiro M, Hashikawa T, Kurata T. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. Acta Neuropathol. 108: 485-492 (2004)

2. 学会発表

1) 小田切孝人 SARS コロナウイルスの鑑別診断とワクチン開発 第8回日米医学急性呼吸器感染症専門部会 国立感染症研究所 1月(2004)

2) Takato Odagiri. Development of new diagnostic tools for sever acute respiratory syndrome (SARS) and for highly pathogenic avian influenza. WHO consultation on a coordinated response for the fast-track development of diagnostic tools for new and re-emerging infectious diseases. Kobe, September, 2004.

3) 小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザ:わが国および世界における現

状、検体体制 平成 15 年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2月(2004)

4) 小田切孝人、西藤岳彦、小渕正次、斉藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代眞人。2003/2004 シーズンのインフルエンザウイルス流行株と2004/05 シーズンワクチン株。平成16 年度衛生微生物技術協議会。埼玉市、7月、2004

5) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、小田切孝人 弱毒化鳥インフルエンザウイルスH5N1を用いたアルムアジュバントワクチンのマウスにおける有効性の検討 第8回日本ワクチンワクチン学会 10 月、札幌(2004)

6) 小田切孝人、今井正樹、二宮愛、納富継宣、峰川晴美、石崎徹、田代眞人 LAMP 法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断系の開発 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、11月(2004)。

7) 小田切孝人、西藤岳彦、小渕正次、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代眞人。2003/2004 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 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、11月(2004)。

8) Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro. Development of H5-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system as a new diagnostic tool for detection of H5N1 avian influenza viruses. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto December, 2004.

9) 小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザの疫学と防疫:人への感染性と対策 平成 16 年度秋季全国鶏病技術研修会 佐賀市、12 月(2004)

10) 小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザ:鳥インフルエンザの問題点と対策 平成 16 年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2月(2005)

11) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小渕正次、小田切孝人:B 型インフルエンザウイルスの増殖過程における BM2 蛋白の機能、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

12) 小田切孝人、今井正樹、二宮愛、納富継宣、峰川晴美、石崎徹、田代眞人:LAMP (loop-mediated isothernal amplification)法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断系の開発、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

13) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、小田切孝人:弱毒化鳥インフルエンザウイルスH5N1を用いたアルムアジュバントワクチンのマウスにおける有効性の検討、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特記事項なし

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3.その他

特記事項なし

Ⅱ．分担研究報告

平成16年度厚生労働科学研究費補助金（特別研究）
高病原性鳥インフルエンザウイルス対策の調査研究
分担研究報告書

ベトナムにおける高病原性トリインフルエンザ感染症の疫学状況

分担研究者　谷口　清州　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　田中　政宏　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　大日　康史　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　重松　美加　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　ポール橘谷　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　中島　一敏　　国立感染症研究所感染症情報センター
分担研究者　上野　正裕　　国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨

2004 年から多くのヒトにおける感染がみとめられながらも他の流行国と比して情報の少ないベトナムにおける同感染症流行の最新情報収集を行い、対策に従事した保健省、医療機関など関係者との意見交換を行うことによって今後の研究協力の可能性を検討した。現在のヒト、家禽症例のサーベイランスはまだ十分ではないと考えられる。同国におけるパンデミック出現の可能性をモニターし、将来のわが国における対策への知見をえるために、今後同国のサーベイランスの強化に積極的な協力を行うことが求められる。サーベイランス制度の確立には時間を要するために、当面は sentinel hospital-based surveillance を併用し、臨床例の治療に関する知見を集積することが必要と考えられた。また、中・長期的な研究協力のためには、日本とベトナムの政府間援助に技術協力を組み合わせたスキームを活用することが有益であると考えられた。

A. 研究目的

2003 年 11 月からアジアを中心に、高病原性トリインフルエンザ（HPAI）の H5N1 亜型による多くの家禽におけるアウトブレイクが発生しており、タイ、ベトナムでは、現時点でも流行が続いている。ヒト感染における疫学状況に関しては、多くのヒトにおける感染が認められた、香港、オランダ、ベトナム、タイで報告が行われており、世界保健機関はこれらの情報をもとにガイドラインを策定している。しかしながら依然として、鳥からヒトへの感染の効率や診断の感度、治療の有効性など不明な部分も多い。そのために、2004 年から多くのヒトにおける感染がみとめられながらも他の流行国と比して情報の少ないベトナムにおける同感染症流行の最新情報収集を行い、対策に従事した保健省、医療機関など関係者との意見交換を行うことによって今後の研究協力の可能性を検討した。

B. 研究方法

国立衛生疫学研究所(NIHE)、Back Mai病院、国立臨床熱帯病研究所、国立小児病院、保健省国際協力部、在ハノイ日本大使館、WHOハノイ事務所、Pasteur Institute in Ho Chi Minh City (PI-HCMC)、Oxford clinical research center in Hospital for Tropical Disease at HCMCを訪問し、関係者より聞き取り調査を行った。

C. 研究結果

1. ベトナムについての背景

国の概要:人口は8000万人。北部は中国広西省に接し、同省からの人・物の移動が多い。中部はラオスと接するが国境には山脈があり物理的な障壁となっている。南部はカンボジアと接し、その国境線は長くほとんどが平地であり、周辺住民の人・物の行き来は多い。北部、中部、南部ベトナムは、歴史・気候が異なり、またフランス統治時代、分断されたこと、またベトナム戦争時代からの歴史的経過より、3つの地域の人々の政治的対立は国内政治に影響している。

行政制度:ベトナムの地方行政単位は3層からなり、まず、第1レベルの地方行政単位として、省(Province)と中央直轄特別市がある。第2レベルとして郡(District)があり、第3レベルとして行政村(Commune)が置かれる。

地方行政単位の数は、ベトナム政府組織人事委員会の資料によると、省レベルで53(50省とハノイ市、ホー・チ・ミン市、ハイフォン市の3中央直轄特別市)、郡レベルで568(471郡、20特別区、62市、15省直轄市)、行政村レベルで1万182(8866村、828区、488町)となっている。各地方行政単位には、地方議会としての役割をもつ人民評議会(People's Council)と地方行政機関としての役割をもつ人民委員会(People's Committee)が設置されている。

医療制度:保健行政的には、国内は北部、中部、南部、高原部の4つの地域にわけられ、最終的にはハノイが保健活動を統合・調整するという形をとっている。ベトナム政府、各省、各郡の保健担当部門では治療局と予防衛生局が独立している。公立医療機関は、数カ所の村にあるコミューンヘルスステーション(予防とプライマリーケアを行う)、郡にある郡病院(主要科のみ)、省にある省病院(総合病院)がある。ハノイ市およびホー・チ・ミン市、またその他の大きな地方都市には小児病院など国立の専門病院がある。大都市ではこれ以外に私立病院、クリニックがある。疾病予防活動は、各コミューン、郡、省ごとに保健部の予防部門が担い、また北部、中部、南部、高原部の4つの地域の地域には、地域予防医学センターがある。その北部のセンターがNIHEであり、南部のセンターがPasteur Institute-HCMC(HCMC:ホー・チ・ミン市)である。伝統的に、NIHEは北部・中部の、高原部、南部ではPasteur Institute-HCMCが公衆衛生のリファアラルラボとして機能している。この二つの研究機関は、フランスのPasteur Instituteとして設立されたことに始まる

2. 現地訪問によってえられた知見

2－1 国立衛生疫学研究所(NIHE : National Institute of Hygiene and Epidemiology)

所長の Nguyen Tran Hien 教授、疫学部部長 Nguyen Thuy Hoa 助教授、インフルエンザ室の責任者(Dr. Mai)、ワクチン製造部門長などと会見(発言は主に Nguyen Tran Hien 教授)。先方からは、ベトナム北部における AIV 感染症のサーベイランスおよび公衆衛生的対策についての次の報告があった。AIV 感染症に関係するサーベイランスについては、現在 2 種のシステムがあり、一つは influenza-like illness(ILI)サーベイランスであり、もうひとつが北部地域で 2004 年から(南部地域では2005年3月から)始まった実験室診断にもとづくサーベイランスである。ILIサーベイランスは、臨床診断(発熱、上気道症状、筋肉痛など)のみにもとづいた患者を報告しており、コミューンヘルスセンターから、郡保健部、省保健部、4つの地域の予防医学センターのいずれか、そしてハノイの保健省予防医学局でまとめられる。ILI サーベイランスは、23 疾患ある届出感染症のサーベイランスのひとつとしておこなわれており、原則上はこれらは全てアクティブサーベイランスであり、各レベルの予防医学センターが下位の公的医療施設(地域予防衛生センターは省病院を、省予防衛生局は郡病院を、郡予防衛生局はコミューンヘルスセンタ)を月に一度訪問して、症例定義に当てはまるものを報告することになっている。2004 年間の報告数は 160 万例程度であった。報告数は過小報告されており、実際はこの数倍の罹患率があると考える。ILIそのものについては、個別の症例調査を要求しておらず、AIV 感染症疑い症例の定義に当てはまる場合のみ、症例調査を実施し症例調査票を提出する。ベトナムにおけるインフルエンザのピークは二峰性であり、3 月と 10 月にピークがある。

実験室診断にもとづくサーベイランスでは、全国 6 か所の病院から(ハノイ市内 2 か所、HCM 市内 2 か所、中部地域のニャ・チャン市内 1 か所、高原地域 1 か所)それぞれ毎週 10 検体が、北部・中部地域は NIHE に、南部と高原地域は Pasteur Institute-HCMC に送られ、RT-PCR で亜型の判定が行われる。(RT-PCR が陽性の場合、PI-HCM は確定診断のために検体を国立感染症研究所ウイルス3部に送っている。NIHEは通常どこにも送っていないために、その診断が正確かどうかは確認できない)。NIHE に送られた検体数は、2004 年に 317 検体、2005 年 1～3 月で 116 検体であり、そのうち 27 検体が H5N1 陽性であった。現時点(3 月 14 日)では中部地域および高原地域からの H5 陽性例報告はない(家禽の集団発生はある)。動物検体は家畜研究所で検査される。公衆衛生学的対応は、患者の早期発見、鶏肉摂取に対する注意喚起、病鳥との疫学関連のある症例のサーベイランス、家畜舎の消毒が原則であり、これに殺処分、ワクチンの使用(中国、オランダから輸入)、ヒトの予防では抗ウイルスの使用を併用してゆく。今後の研究では、家禽以外のAIVの保有動物の有無、ヒトの無症候性ウイルス保有者の有無と保有期間、感染経路と感染リスク・ファクター、発症と遺伝的素因の関係、AIV の変異などを解明していくことが計画されている。

今後の日本との協力については、「AIV感染症サーベイランスの強化策の検討および家族集積例(ベトナムでは現時点で 5 例)に