

について遺伝的原因についての研究(HLA 解析など)は行える」との前向きな発言がなされた。また、家禽間の集団発生およびヒト症例のある省において、感染リスクのある無症候者の血清サーベイを行うことが WHO から提案されており、NIID も協力する用意がある旨述べたが、こちらも NIHE 側からは具体的協力の申し入れはなかった。

2-2 Back Mai 病院(BMH)

BMH は、北ベトナムの医学教育の中心的大学であるハノイ医科大学の臨床研修病院であり、北ベトナムでは最も権威が高い病院とされる。そのなかには、国立臨床熱帯病研究所(Nat'l Institute of clinical research in tropical medicine)があり、同病院は 2003 年度のハノイでの SARS の流行時、および昨年以降の AIV の感染の成人症例の入院施設となっている。ここでは病院長 Professor Tran Quy および副院長と会見した。AI の対策に関しては、政府の AIV 感染症対策委員会より、院内感染予防、および治療に関してのガイドラインがつくられており、それにのっとって対策と治療がおこなわれているとの説明があった。

国立臨床熱帯病研究所においては所長を訪問。同研究所内の病院は北部ベトナムで大人の AIV 感染症例が確認された場合の referral 病院となっている。2004 年のヒト症例の発生から同院にはこれまで 40 人程度の大人の患者の入院があった。AIV 感染症例を受け入れている病棟の訪問を許可されたが、訪問時点では Thai Binh 省からの 21 歳の男性患者(WHO 報告があった患者)のみが入院していた。病棟は 2 階にあり、BMH の呼吸器病棟とはことなり、外部からの人の出入り

には制限が加えられていた。患者は陰圧ではない通常の個室に入れられており、入院部屋のドアは開放されたままで、廊下を他の病室の患者や面会者が行き来していた。また職員のなかにはゴーグル、手袋を使用せずに病室に出入りし、診察するなど、WHO の勧告する AIV 感染の interim infection control guideline には必ずしも従っていなかった。主治医によると、症例の入院後の進行はきわめて迅速であり、また小児病院のいくつかの症例と同様に肺の硬化が強く、人工呼吸器の使用により両側の気胸を起こしていた。

2-3 国立小児病院(National Hospital of Pediatrics: NHP)

所長の Nguyen Thanh Lien および副所長の Khu Thi Khanh Dung と会見。以下の説明をうけた。全国に 8 つある小児病院のひとつで、スウェーデンが援助。臨床検査部が充実しており分子生物学的診断も可能。北ベトナムにおける小児の重症肺炎は、NHP が referral 病院となっている。2003 年 10 月ころから重症肺炎の入院が相次いだ。SARS の検査で陰性であった。2004 年はじめにきた症例の検体を香港の提携ラボにおくったところ H5N1 陽性となった(ウイルス分離できないために、NIHE でも不明病原体の同定はできない)。国立臨床熱帯病研究所の症例と同じく、これらの臨床例の経過はきわめて早く、時間ごとに急激に症状が進行した。肺は硬化し人工呼吸で気胸が起こりやすかった。最近(2004 年 12 月からの 3rd wave 以降の例)も重症肺炎の症例が 4 例あったが検査の結果 H5 は陰性であったために、AIV 感染症とはなっていない。今後日本

との臨床研究の協力は積極的に行いたいとの意向であった。

2-4 ベトナム保健省国際協力局

局長の Tran Trong Hai 氏および予防衛生局の Dr. Duong 氏と会見。先方からは AIV 感染症を含めた研究協力も広く歓迎することが表明された。ODA ハードの供与は国際協力局および該当研究機関の担当、技術協力は各研究機関の主幹事項とのデマケがある印象を受けた。

2-5 ハノイ日本大使館

滝川書記官(経済班医療部門担当、農水省より出向)と会見、同書記官より以下の説明を受ける。保健省、農業省の専門化レベルでは、サーベイランスの強化が重要と考えているが、ベトナム政府の政治家レベルではそういう認識はない様であることが気になる。日本への、H5 ワクチンの開発への協力依頼があるが ODA としては協力しない方向。また、ベトナムの家禽はおもに国内消費向けであり、タイ政府とはことなり今後ベトナム政府は今後ワクチンを使うことに抵抗は少ないと考えられる(Thanh Nien News, 11 Mar 2005

<http://www.thanhniennews.com/healthy/?catid=8&newsid=5493>でも、4 月にメコンデルタのアヒルにワクチン接種を予定していることを報告)。ほかに日本の保健分野に関する政府間援助の状況について会談した。

2-6 WHOハノイ事務所

Communicable diseases surveillance and response section の AIV 感染症担当医務官 Dr Peter Horby と会談した。これまで訪問し

た医療機関の状況を報告し、加えて以下のことなどについて会談をおこなった。

AIV 感染症対策一般:NIID からは、ベトナム国内のヒト感染例の増加・感染経路の変化を把握するために、「early warning system」の構築が必要ではないかとの提案を行う。Dr Horby からは、「既に保健省が2つのサーベイランスシステムを持っているが、確かにその感度については十分ではないと考えられる」と。また「バングラデシュにある国際下痢症研究所(ICDDR/B)ならって、国際呼吸器疾患研究所のようなものをベトナムにつくればよいのではないかと個人的には思う。」と。

日本のインフルエンザワクチンの供与の可能性について:供与された海外のワクチンには、審査をへて CENCOBI(ベトナム保健省のFDAにあたる組織)から個別にライセンスがあたえることが可能。実際に、昨シーズンは北半球にあるワクチンメーカーから WHO を通じて、生産国で使われなかった 25,000 ドーズのワクチンの供与があった。問題は、残った使用期間が短いこと、そして誰に接種するべきかの優先順位をきめるのが難しいことである。医療従事者や、AIV 症例のある地域などを考えている。家禽との接触のある人口は、ワクチン量に比して多すぎるので接種できない。

2-7 Pasteur Institute in Ho Chi Minh City (PI-HCMC)

Enterovirus/respiratory virus/arbovirus laboratory

チーフは Dr. Phan Van Tu 医師。Tu 氏は、ウイルス学者であるが、自らフィールド調査も積極的に行い、患者発生の現場の状況に

通じている。同氏より、南部の症例についての報告を聞く。ベトナム南部では、2003 年 12 月から散発的な家禽の死亡が報告され、2004 年 1 月には大量死が報告されるようになった。ベトナム全土では 4000 万羽の家禽が死亡または殺処分されたとされ、これらは主に南部地域の家禽である。

2004 年に南部地域で呼吸器症状を発症した患者のうち、WHO の Interim case definition にもとづいて AIV 感染が疑われるとされた患者 192 人からの検体(咽頭、鼻咽頭ぬぐい液)を NIID および CDC との協力のもとで検査した。(ただし、AIV 感染を疑う患者の選定は臨床家の印象に左右され、重症例が選ばれる傾向があると考えられた。)また、これらの患者の接触者(無症状の)からの検体(30 咽頭ぬぐい液、51 血清検体)、病鳥との接触のあった無症状の家禽飼育者からの検体(25 ペア血清検体)、および患者との性と年齢でマッチさせたコントロール群からの検体(43 血清検体)も同様に検査した。結果は、192 人患者のうち 14 例が H5N1 陽性であり(うち 10 人が死亡)、1 例がインフルエンザ A 型陽性かつ H5 陰性、あとはすべて陰性であった。無症候接触者、無症状飼育者、コントロール群からの検体はすべて陰性であった。

以下は上記の感染確定例 14 例についての疫学情報:4 例は感染鳥との接触歴がなく、他の例では鶏肉調理、アヒルや闘鶏との接触などの接触が確認された。ただし、ベトナムでは鶏やアヒルは広く分布し日常生活のなかでの接触も多くかつ広く食されているので、明らかな病鳥との密接な接触がない限り、家禽との接触を感染源と肯定することもまた否定することも困難である。今のところ、明ら

かなヒト-ヒト感染は確認されていない。2 例のみが家族集積例(同胞)であり、その患者の家の傍で鶏の集団死が確認されたが、患者はこれらとの密接な接触はなかったとされる。14 例の患者の年齢は 1-28 歳のみに限定されており、住居環境は、Ho Chi Minh City などの都市部、郊外、農村部、山間部など様々であった。患者の症状では、十分な臨床検査の得られた 10 例のうちすべての例で発熱、咳、呼吸困難、リンパ球減少、胸部レントゲン像の異常をみとめ、7 例で下痢を認めた。また、HMC 熱帯病病院でインフルエンザ A 型の迅速キットによる診断を行った 4 例のうち 2 例が陰性であった。今のところ、家禽飼育者や医療従事者の感染例は南部では確認されておらず、感染鳥との接触以外感染のハイリスクファクターは明らかではない。ただし、家禽飼育者や医療従事者血清疫学調査は行われていない。

感染家禽のサーベイランスは必ずしも十分とはいえないと考えられる。家禽の死亡をとどけると家禽をすべて殺処分される可能性があるので、積極的にとどけようしない傾向がある。また、死因不明の家禽を食べることも行われている。少なくとも今のところ南部では野鳥の大量死は報告されていない。また、鶏糞が果物・コーヒーの肥料として広く使われているので、それからの野鳥、家禽への感染の可能性も懸念される。

家禽における AIV の検査は、HCMC にある Animal Health Center で行われる。Pasteur Institute-HCMC では定期的に Animal Health Center 職員を送って情報交換をしている。

2-8 Oxford clinical research center in

Hospital for Tropical Disease at HCMC

同研究所の Dr. Menno De Jong と会見。同氏はオランダ人の医師/微生物学者である。ベトナムの AIV 感染症についての論文「Avian Influenza A(H5N1) in 10 patients in Viet Nam」、「Fatal avian influenza in a child presenting with diarrhea followed by come」(いずれも New England Journal of Medicine 誌)などを発表している。同研究所は、医学研究を対象としたファンディング・チャリティー機関としては世界有数のウェルカム・トラスト(Wellcome Trust)の基金をもとに 1991 年から HCM 市の Hospital for Tropical Disease で活動している。同病院は HCM 市立で、南部地域の感染症の referral 病院となっている。ウェルカム・トラストと HCM 市は、同病院内に3階建の施設を作り、そこが同病院の臨床検査部および Oxford clinical research center の研究所となっている。研究所内には、AIV の分離可能なベトナム唯一の BSL3 ラボがある。AIV のための動物実験も可能である。施設の所有は病院であるが使用権は Oxford が持っている。

同研究所所長は Oxford からの派遣であり、Oxford からの研究者は 10 人で、ウイルス学者、細菌学者、免疫学者、感染症専門医、昆虫学者などで、国籍はイギリス、オランダ、オーストラリア、オーストリアなどと多様である。ベトナム人スタッフも多く、Pasteur Institute-HCMC を定年退職した日本脳炎の専門家も働いている(Professor Ha)。将来的にはベトナム人スタッフのみの運営を目指す。現時点では Safety cabinet がきちんと使われていないなど危険なこともあるのでその点 Oxford の指導がまだ必要である。ただし、

Oxford の臨床家は患者を直接診察するのではなく、ベトナム医師のアドバイザーとして働いている。

同研究所は 5 年ごとの契約でウェルカム・トラストからの研究費援助を受けている。現在の予算は 5 年分で 1000 万ポンド(20 億円)である。これには施設の運営費、職員の給与、ベトナム人研究者のイギリスでの研修費用なども含む。協力先として、Pasteur Institute-HCMC でなく、Hospital for Tropical Disease を選んだのは、閉鎖的である保健省の組織よりこちらのほうがやりやすいからであると。

Pasteur Institute-HCMC の Tu 氏によると、Oxford clinical research center は高給のため(月額 \$ 500) Pasteur Institute-HCMC の職員が、何人か引き抜かれている現状もあると。

D. 考察

家禽のサーベイランス:

ベトナム国内で、家禽間の集団発生の報告が十分行われているかは疑問。個々の家庭での消費で小規模に飼われている家禽が死んでも、殺処分をおそれて報告はされない可能性が高い。ベトナム政府はハノイの中央集権体制とはいえ自治体の人民委員会の力は強く、また地域による独立性も高く、家禽の集団発生があっても自治体も経済的損失を恐れて中央政府に報告していない可能性がある。今後もサーベイランス強化がもとめられるが、経済的理由から困難が予想される。鶏と鴨を生きたまま販売することは原則的に禁止されているがどこまで守られているかは不明。ハノイ、HCM とともに訪問した

レストラン(主に外国人向け)においていずれも鶏肉料理の提供はおこなわれていなかったが、鴨肉料理は提供されていた。

AIV 感染症予防策:政府は感染家禽に注意するよう住民への広報につとめているようであるが、鶏・アヒルを重要な食料源、収入源としている農村部の住民習慣を変えるのは困難と考えられ、家禽の血液を飲むなどのきわめて危険な習慣も続いている。この困難さはベトナム人専門家も同様に考えている。今後も国民への広報の努力は必要であるが、家禽間の流行が続く限り今後もヒト症例の発生が続くことが予測される

ヒト症例のサーベイランス:

現在のサーベイランスが、ヒトの AIV 感染症例を早期に探知するに十分な感度をもっていているとは考えにくい。ILI サーベイランスでは、患者数の著大な増加しか把握できず、実験室診断にもとづくサーベイランスではカバーできる患者数が過小である。ただし後者は、実験室の検査能力の限界によりこれ以上拡大することは困難である。

高次病院で sentinel hospital-based surveillance を併用することは比較的容易であるが、これにも現状では限界があるように思われる。ベトナム北部および南部の高次病院に運ばれた重症肺炎患者は把握されうるが、i)地理的に転送の困難な地域の患者、ii)高次病院に転送される以前に死亡した患者、および iii)軽症の AIV 感染症例は十分把握されえない。また、国立小児病院で重症肺炎の症例が 4 例あったが NIHE での検査で H5 は陰性であったことからこれらは AIV 感染症とされていない。このように北部・中部の高次病院に運ばれた患者でも、

NIHE での検査で陰性であったために、AIV 感染と認識されていない例が他にもある可能性が高い。

特に中部地域、高原地域では家禽鳥インフルエンザの集団発生が報告されているにもかかわらず、これまでヒト症例がないのは疑わしいという指摘が訪問中のベトナム側の複数の専門家からも聞かれた。期せずして、われわれの滞在最終日(3月18日)には、中部 Quan Binh 省での初の症例(家族集積例)が現地新聞で報道された。新聞によると、鶏肉をたべた家庭のうち子供 3 人、うち 1 例死亡、1 例回復、1 例重症。重症例の検体から NIHE で H5 検出。同省では 2005 年 1 月にも家禽の集団発生が OIE に報告されている。(国際的には、更なる詳細が 3 月 20 日付けの Promed で報告された)。ベトナム中部は、ポリオ根絶の際に全国で強化しておこなわれた AFP サーベイランスも北部・南部に比してサーベイランスが十分でないとされたところであり、AIV 感染症についても同様であると考えられる。

家禽間の集団発生が広くみとめられている南部での血清疫学調査の結果から推定すると、報告されていない例は少なくないものの、ベトナム国内での AIV ヒト感染はまだ希であるように思われる。今のうちに、今後ヒト感染例の罹患率および感染経路の変化(ヒトヒト感染を思わせる症例の増加)があった場合それを把握するために、現在のサーベイランスシステムを補足するシステムの構築が必要である。そのためには、まず現行のサーベイランスシステムおよび高次医療機関における患者の把握の程度を評価することが必要である。そして、それに基づいて各省(可能なら郡)の中核病院を含めた重症肺炎

のサーベイランスと個々の疫学調査を強化し、また NIHE での検査結果を WHO レファレンスラボで確定できる制度の確立が必要である。これについてベトナム政府の理解を得られるように、WHO などの協力機関と粘り強く協議することが求められる。

NIID とベトナムとの今後の研究協力について:

過去ベトナムとの研究協力を行った NIID の研究者および WHO の短期専門家としてベトナムを訪問した CDC の研究者などからの情報によると、NIHE および Pasteur Institute-HCMC の微生物学研究・技術のレベルは途上国としては高いものの、研究者・研究機関間の格差が大きい傾向にある。Pasteur Institute-HCMC にはこれまで NIID の技術協力がつづけられておりある程度その技術レベルがわかっているものの、NIHE のインフルエンザラボの技術に関しての詳細は不明である。この点、これまで協力をしている新潟大学や東大医科学研究所を通じての評価が必要である。また、実験室研究の能力に比して疫学研究が弱い傾向にある。今後、感染ルートの推定、感染リスク・ファクターの同定、患者年齢が若年者に偏っている理由の解明など疫学的研究の必要は高いために、日本の協力による疫学研究強化が望まれる。

1. NIHE は、今のところラボにおける協力および情報公開について積極的な姿勢を見せないために、ベトナム北部および中部地域での AIV 感染症の発生状況をつかむことは現時点では困難である。これについては日本だけでなく、米国 CDC の専門家も同様の

印象を持っている。ただし、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についての遺伝的要因についての研究については、今後も対話を継続したいとの連絡が NIHE 所長より再度送られてきており、この分野での協力の可能性は残されている。

2. BMH、その下にある国立臨床熱帯病研究所および国立小児病院は、臨床分野の協力には少なくとも現在のところはきわめて前向きである。国立国際医療センターなどの国際協力および臨床研究に実績のある医療機関を通しての積極的な症例の情報交換・治療方法の確立がもとめられる。また、北部・中部での AIV 感染症のサーベイランスが強化され、かつより多くの情報公開されるようになるまでの当面は、国立臨床熱帯病研究所、BMH 臨床検査部、および国立小児病院との臨床分野での協力を通じて、間接的に北部における不明肺炎症例の罹患率・疫学特性の変化をモニターすることが有益と考えられる。

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。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、発生国の対策については世界における対策に貢献していくことが必要である。

F. 健康危険情報

3 月 18 日に、中部 Quan Binh 省での初の症例(家族集積例)が現地新聞で報道され

た。新聞によると、鶏肉をたべた家庭のうち
子供 3 人、うち 1 例死亡、1 例回復、1 例重
症。重症例の検体から NIHE で H5 検出され
た。これは即座に本邦へも情報としてもたら
されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

平成 16 年度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
分担研究報告書

高病原性トリインフルエンザウイルス対策の臨床的調査研究

分担研究者 工藤宏一郎 国立国際医療センター国際疾病センター
分担研究者 川名明彦 国立国際医療センター国際疾病センター

研究要旨

ヒトにおける鳥インフルエンザ A (H5N1) の流行状況、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。

A. 研究目的

一般に鳥インフルエンザは鳥類の感染症と考えられてきたが、1997 年香港におけるヒトの鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルス（以下 H5N1 と略す）のアウトブレイク以降、ヒトに対しても重篤な感染症を起こしうることが認識された。H5N1 は効率の良いヒト-ヒト感染は起こさず、感染鳥との濃厚な接触によって感染が成立するが、2005 年の現時点においてもベトナムやタイ、カンボジアではヒト感染事例が次々に報告されている。わが国ではこれまでヒト感染事例は無いが、山口県等の養鶏場ではニワトリが H5N1 の被害を受けており、ヒト感染例が発生する可能性は十分ありうる。また、H5N1 のアジア地域での流行を背景として所謂新型インフルエンザが出現し、パンデミックに移行することも懸念されている。日本も H5N1 患者発生に備え、臨床

的にも早急な対策が必要である。

かかる状況を背景として、我々は次の 4 点を本研究の目的とした。①H5N1 感染患者の臨床像を明らかにすること。②現在の治療の状況とその有効性を評価すること。③感染対策の現状を把握し、改善点を明確にすること。④本疾患に関する今後の臨床研修、臨床研究の可能性を検討すること。

B. 研究方法

対象：2005 年 3 月の時点で最も多くヒトの H5N1 感染事例が報告されているベトナムを調査地域とした。同国において、実際にヒトの H5N1 感染者の診療を担う病院であるハノイのバクマイ病院、同熱帯病研究所付属病院、ハノイ国立小児病院、ホーチミンの市立熱帯病病院を対象施設とした。
方法：上記施設において、患者の臨床像、治療とその結果、感染対策の状況について担当医師より聞き取り調査を行う。同時に、

今後の日本人医師の現地での臨床研修、臨床研究も含めたベトナムとの連携の可能性につき調査を行う。

C. 研究結果

ベトナムにおけるヒトの鳥インフルエンザ感染症の現状：2004 年 1 月から 2005 年 3 月中旬までに 51 名の H5N1 感染者と 33 名の死亡者が確認されており、現在も流行は終息していない（本研究期間中にも中部ベトナムで 3 名の新患者発生の報告があった）。現在は同国の第 3 波目の流行に当たる。ベトナム国内で同感染症のサーベイランスが行われており、新患者は保健省や現地 WHO 事務所が把握できる体制が採られている。患者は同国の referral system に従い、地域の診療所から高次病院へと順次紹介されるため、設備の整った医療機関に到達するまでに日数を要し手遅れとなる例がある。H5N1 感染症の臨床像：患者は小児～若年の特段のリスク要因を持たない例が多い。症例の大部分は鳥（病気・死亡鳥を含む）との接触歴があるが、接触歴のはっきりしない例や家族内多発例もある。ヒト-ヒト感染の明確な証拠は無い。潜伏期間は 2-4 日であるが、更に長いと思われる例もある。初診時の症状は、発熱、咳嗽、呼吸困難など非特異的な症状が主である。初診時すでに肺炎や呼吸不全を呈しているものが多い。検査では、末梢血白血球数、リンパ球ならびに血小板の減少、ALT、AST の上昇が認められる。胸部 X 線所見では、多彩な肺炎像を認める。ARDS、気胸、胸水も見られる。なお、同国では死亡患者の解剖はほとんど実施されていないため、病理学的情報は乏しい。治療：タミフル®が使用されるが、先述の理由により発病後 1 週間以上経ってから使用される例が多く、

同薬の有効性の評価はできていない。その他、ステロイド、広域抗菌薬が使用される（治療に関してはベトナム語のマニュアルがある）。感染対策：本研究期間中、唯一の H5N1（すでに発病後 1 ヶ月以上経ち急性期ではない）患者がバクマイ病院熱帯病研究所付属病院に在院中であつた。同病院では同患者を個室管理とし、診療に当たっては N95 マスク、ガウンを着用していた。病棟は他の患者と共用で、廊下には一般の見舞客もいた。今後の臨床研修、臨床研究の可能性：ハノイのバクマイ病院、同熱帯病研究所付属病院、ハノイ国立小児病院では、日本の臨床医との連携を歓迎する旨確認できた。ホーチミンの市立熱帯病病院では、すでに英国オックスフォード大学と共同で研究施設が運用されており、P3 実験室も設置されていた。

D. 考察

ベトナムではヒトの H5N1 感染事例は現在も散発的に報告が続いている。発病した場合は重症化しやすく致死率も高いため、早急な対策が必要である。現在唯一の治療薬といえるノイラミニダーゼ阻害薬（タミフル®）は発病 48 時間以内の使用開始が推奨されているが、ベトナムの医療システムの中では早期に患者を発見し治療を開始することが困難と思われた。患者を可及的速やかに発見し、迅速に治療を開始できるシステムの構築と、早期治療を開始した場合の有効性に関する臨床研究が直ちに必要である。病態解明という点からは病理解剖が不可欠であるが、同国の剖検率は極めて低く、今後の啓発活動が必要と思われる。H5N1 は高効率のヒト-ヒト感染は無いと考えられているが、本疾患の極めて高い致

死率や通常のヒトのインフルエンザとの遺伝子再集合の危険性をも考慮した、嚴重な感染対策が必要である。また、H5N1 感染患者に通常のヒトのインフルエンザを重感染させないためにも病棟への見舞客の制限などの配慮も必要と思われる。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。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を提案したい。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。

E. 結論

H5N1 感染症は重篤な疾患であり、日本も早急な準備が必要である。そのためにはベトナムなどの感染多発地域との情報共有が必要である。有効な治療、早期発見のためのシステム作り、感染対策など早急に検討すべき課題が多い。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 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
2. 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
3. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）
分担研究報告書

高病原性鳥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

分担研究者 小田切孝人、小淵正次、今井正樹、二宮愛
(国立感染症研究所ウイルス第3部第1室)

共同研究者 納富継宣、峰川 晴美 (栄研化学株式会社生物化学研究所)

研究要旨 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 診断感度を向上させた。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。一方、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、現地研究機関での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。

A. 研究目的

2003 年末から 2004 年初頭にかけて日本を含む東アジア地域で多発した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行は、沈静化と再流行を繰り返し、ヒトへの感染死亡事例も依然として増え続けている。ベトナムやカンボジアでは第3波の流行が現在進行中であり、ヒトからヒトへの感染例を疑わせる症例もいくつか報告され、本ウイルスによるパンデミックが危惧される。

H5N1 鳥インフルエンザの感染診断は RT-PCR による遺伝子検出が中心となっているが、検出感度が必ずしも高くないことから陽性例を見逃すケースも少なからず発生している。このことから、より高感度で迅速に遺伝子検出ができる検査系の開発が望まれている。

一方、東南アジア地域など H5N1 鳥インフルエンザの流行地では、実験室感染診断系は稼動しているものの、その精度管理に問題があり診断系の検証と改善のための技術支援が必要である。

本研究では、現行の RT-PCR の感度の改善、RT-PCR より高感度検出が期待される H5-LAMP キットの開発と実用化など診断系の改良を行ない、それと並行して、流行地（ベトナム）へ研究員を派遣し、現地研究機関での診断系の改

良と精度管理の指導などの国際貢献を目的とした。

B. 研究方法

1 H5N1 ウイルス感染診断

H5N1 ウイルス感染が疑われる患者から採取した検体を東南アジア（南北ベトナム）から入手し、A 型インフルエンザウイルスに共通する M 遺伝子プライマー、H5 特異的プライマー、対照として H1、H3、B ウイルス特異的プライマーをそれぞれ用いた RT-PCR を行った。並行して、H5 陽性検体については MDCK 細胞または孵化鶏卵に接種してウイルス分離を行った。

2 H5-LAMP 法の開発と実用化

2004 年にベトナムのヒトから分離された H5N1 ウイルスの HA 遺伝子配列を基にして、6 種類のプライマーを設計した。これらを市販の LAMP キットに適応させ H5-LAMP キットとして実用化した。

3 海外における診断技術支援

ベトナム、ホーチミン市にあるパスツール研究所の腸管系・呼吸器系ウイルス研究室において、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実験室内遺伝子診断の技術支援を行った。ベトナム

南部の各省の病院ならびにホーチミン市内の熱帯病病院より同研究所に搬送された、鳥インフルエンザウイルス感染疑い患者の臨床検体について、RT-PCRによるA/H5亜型の同定を行った。さらに、RT-PCRより検出感度の高いH5-LAMPの導入を検討するとともに、同研究室における遺伝子診断系全体の評価および改良を行った。

C. 研究結果

1 RT-PCRの改良。

2004年の国内での高病原性H5N1鳥インフルエンザの流行に際して、我々はH5ウイルスのHA遺伝子を検出するためのRT-PCRシステムを構築し、感染研ホームページに掲載した(http://idsc.nih.go.jp/disease/avian_influenza/RTpcr.html)。この系は最近のH5流行株を $10^{1.3\sim 1.7}$ TCID₅₀程度の感度でしか捕らえることができなかった。そこで、検出感度を向上させるために、これまで採用してきたone-step RT-PCR法から各RNA分節末端に共通なプライマーを用いたRT stepと従来どおりのH5亜型特異的プライマーによるPCR反応とを分けたtwo-step法に変更した。さらに、サイクル数を30から40に増やした。これによって、検出感度を10倍程度上げることができた(病原体検査マニュアル:「高病原性鳥インフルエンザ」として地衛研に配布予定)。本法はone-step法より実験室内交叉汚染の危険性が高まることから、PCR操作手順や実験室のレイアウトを再考し検査精度の定期的な管理が必要となる。

2 H5-LAMPキットを用いた診断系の開発。

簡便で短時間に遺伝子を検出できる系としてSARSをはじめいくつかのウイルス感染診断に採用されているloop-mediated isothermal amplification (LAMP)をH5ウイルス遺伝子検出診断用に開発した。プライマーは2004年の第1波の流行でヒトから分離されたH5N1ウイルスのHA遺伝子配列をもとに設計し、その亜型特異性および検出感度について検討した。

設計したプライマーはH5亜型のみに反応し他の14亜型ウイルスとは全く交叉反応しないことが確認された。一方、検出感度について調

べたところ、現行のone-step RT-PCRに比べて約100倍高感度であり、H5ウイルスの検出限界は $10^{-0.2\sim -0.5}$ TCID₅₀であった。これによって、H5N1ウイルスの感染診断にRT-PCRに加えて新たにH5-LAMPシステムの導入が可能となった。

3 高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス感染診断と分離株の性状解析。

わが国や東南アジア諸国における第1波のH5N1鳥インフルエンザの流行は4月には終息したが、8-9月にかけて再びベトナム、タイで第2波の流行が起こった。感染研ではハノイ市の国立衛生研究所から検査依頼を受けた10検体についてRT-PCR、H5-LAMPおよびウイルス分離検査を行った。その結果、3検体の陽性例を検出し、そこから2株のH5N1ウイルスが分離された。

赤血球凝集抑制(HI)試験による抗原解析の結果、分離株の抗原性は第1波の流行株やWHOが推奨するワクチン株(A/VN/1194/2004)と類似していることが分かった。また、遺伝子解析の結果、2004年から分離されている多くの株と同じグループZに分類され、第1波も第2波も類似した株による流行であることが示された。

一方、ホーチミン市のパスツール研究所から入手した第2波の流行から採取した検体からは、H5N1とH3N2陽性例がそれぞれ1検体見つかり、それぞれからウイルスも分離された。このことは、ベトナム南部ではヒトインフルエンザと高病原性鳥インフルエンザが混合流行している可能性が考えられる。

これらの成績は、速やかに検体採取国へ報告され、それと並行してWHOネットワークにも報告され、WHOのパンデミックワクチン株の変更の有無に関する議論のための資料となった。

4 海外流行地域に対する技術支援

2004年の第1波の流行の際に、感染研はPI研究所に研究員を2名派遣し、RT-PCR診断系の構築を行った。1年が経過した2005年1月から2月にかけて、再度研究員を2名づつ2回に分けて派遣し、RT-PCRの感度再検やdata整理の適正化について指導を行った。派遣期間中にRT-PCRにより4例のA/H5陽性例を現地で確認

することができた。しかしながら、現有設備の不備や現地スタッフの基礎知識や遺伝子診断の経験不足により、期待される RT-PCR の感度を大きく下回る精度で検査が行われていたことが判明した。

そこで、新規に企画していた H5-LAMP の導入は断念し、現行の RT-PCR の感度の改善と精度の検証を最優先し、擬陽性および擬陰性の診断結果を可能な限り排除できるように診断系を再構築した。これには、実験室内交叉汚染を排除するための作業手順、作業区域の再レイアウト化も含まれる。これによって、現行の診断系が抱えている多くの改善すべき問題点が明確になり、今後の支援課題として残された。

さらに、検査結果の確認試験および現地では実施できないウイルス分離検査を行うために、感染研に臨床検体を送付する段取りを行った。これによって、P I 研究所から 1 月に 78 検体、2 月に 28 検体が感染研に送付され、確認診断とウイルス分離検査が実施された。

D. 考察

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当分終息しそうにない。さらに、ヒトの H3N2 ウイルスも鳥インフルエンザ感染疑い例から分離されていることから、鳥とヒトのインフルエンザウイルスの遺伝子再集合体の形成とそれによるパンデミックの発生の危険性は確実に増している。従って、パンデミックに備えた対策を急ぐ必要がある。

本研究では、H 5 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 H 5 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 H 5 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。

E. 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)

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 小田切孝人 SARS の検出 からだの科学 [増刊] 9-14 (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 severe 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、小淵正次、斉藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。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。埼玉県、7月、2004

5 二宮愛、今井正樹、田代真人、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、田代真人 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、小淵正次、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人。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、小淵正次、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、田代真人:LAMP (loop-mediated isothermal 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、田代真人、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

F. 知的所有権の取得状況

なし

平成 16 年度 厚生労働科学特別研究事業
「高病原性トリインフルエンザウイルス対策の調査研究」
分担研究報告書

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

分担研究者 西藤 岳彦 国立感染症研究所

2003 年年末からベトナム、タイで発生した高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト感染症は 2004 年中期にいったん終息したかに思われた。しかし 2005 年 1 月から再び散発的にベトナム北部、南部で再発した。ヒト感染の再発に伴いホーチミン市のパスツール研究所から依頼され現地に赴き実験室における遺伝子診断に関わる技術移転協力を行った。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。

A. 派遣目的

1997 年のいわゆる香港トリインフルエンザ事件で 18 名が感染し 6 名が死亡して以来、高病原性トリインフルエンザ (Highly pathogenic avian influenza; HPAI) H5 亜型感染によるヒトへの感染事例は単にその健康被害の影響だけにとどまらず、HPAI 由来の新型ウイルスによるインフルエンザの大流行 (パンデミック) につながる潜在的危険性を秘めている。

2003 年年末から 2004 年にかけて日本、韓国を含む東南アジアの各地域で HPAI H5 亜型の家禽での流行が報告された。特に、タイ、ベトナムでは家禽での流行にとどまらず、人での感染被害が確認され、両国あわせて 40 名以上の感染、および 30 名以上の死亡が確認された。2004 年のベトナムでの HPAI ヒト感染に際し、報告者はベトナムホーチミン市パスツール研究所に WHO/GOARN (Global alert and response network) のメンバーとして派遣され 2 週間にわたって、パスツール研究所腸管および呼吸器系ウイルス室での H5 型 HPAI 遺伝子診断の技術指導を行った。

その後、ベトナムでの HPAI のヒト感染事例は家禽での

流行が終息するに伴って、終息したかに見えていた。

2005 年に入り、ベトナム北部、南部ともにヒト HPAI 感染が再発したことが確認された。北部では臨床症状、疫学情報ともに HPAI 感染を疑われる患者の遺伝子診断結果を得るまでに数回の再検査を必要とした。また南部でも、疑い患者の入院先での遺伝子診断の結果とパスツール研究所における診断結果が初期の段階で一致しなかった。これらの事例を受け、パスツール研究所は WHO を通して感染研にサイド技術協力を要請してきた。また、NIHE では新たな診断技術の導入が必要と判断し、WHO が立案し、CDC および感染研が協力する形で Real time PCR 技術を中心としたワークショップを開催すること依頼してきた。

感染研では、パスツール研究所に対する技術支援として 1 月に 2 週間 2 名の研究員を派遣して、遺伝子診断技術の指導を行った。さらに継続的な支援の要請に応える形で、ウイルス第 3 部 2 宮研究官と報告者が 2 月中旬におよそ 2 週間の日程でパスツール研究所での技術協力を派遣された。また報告者はハノイの NIHE でのワークショップにも米国 CDC より派遣された Stephen

Lindstrom 博士とともに講師として参加した。

B. 派遣日程

2004 年 2 月 14 日 ホーチミン市着

2004 年 2 月 15 日から 21 日 パスツール研究所

2004 年 2 月 22 日 ハノイ市移動、NIHE で打ち合わせ

2005 年 2 月 23/24 日 NIHE にて WHO/CDC/NIID 合同ワークショップ

2005 年 2 月 25 日 WHO ベトナム事務所訪問

2005 年 2 月 26 日 帰国

C. 研究結果

感染研ではパスツール研究所と協力して、パスツール研究所に送られてきた H5 感染疑い例の全検体の送付を受け、感染研での再検を実施していた。報告者がパスツール研を訪れる前に既に 35 検体について RT-PCR による再検が終了していた。その結果、7 患者 11 検体分についてパスツール研での検査結果が偽陰性であることが明らかになっていた。

そこで、パスツール研で偽陰性が発生した原因を検討するために、現地の研究、技術者とともに実験記録の検討、実験手技、機器の検討を行った。

実験記録の検討の結果、擬陽性が多発した実験時期の前後で、陽性対象のために使用している RNA の希釈に変動があることがわかった。現地の担当者によると、それまで使用していた陽性対象希釈では陽性反応が得られないため、保存中に RNA の分解が生じている可能性を疑い、より希釈の少ない RNA を使用するようにしたとの説明を受けた。

さらに実験記録で電気泳動の写真の一部に不鮮明なものがあり、写真撮影装置の不備が考えられた。写真撮影装置の不備は、撮影装置の製造メーカー技術者を呼び、改善することが出来た。また、製造メーカー技術者の方から直接担当者に適切な使用法を指導してもらうことで、使用法の統一を図ることが出来た。

陽性対象 RNA に関しては、再度低希釈の RNA 溶液

から希釈系列を作成することによって、改めてパスツール研での RT-PCR 法の感度測定を行うことにした。感度測定の実験をととして、現地技術職員の実験技術習熟度を把握することが可能であった。技術職員は 4 人いたが、うち 3 人は 2005 年になってから採用された職員で、技術の習熟度に若干の問題があり、そのために RT-PCR 法の感度が低下していた可能性が強く示唆された。この為、問題点を指摘し、改善点をプロトコールに記入することによって、常時職員が試薬の準備方法等に注意を払うよう指示した。

最終的に実験技術上の問題点の改善、陽性対象の再設定、機器の整備修了後、偽陰性であった 11 検体中オリジナル検体が残っていた 10 検体について、現地技術職員による再検をおこなった。その結果、10 検体中 4 患者分 6 検体について陽性反応が認められた。残り、3 患者 4 検体については再検によっても陰性であった。

NIHE におけるワークショップは、CDC から派遣された S. Lindstrom 博士を中心に行われた。博士の講義は、診断技術に関連して重要になる検体の処理方法、バイオセーフティー上の問題点をはじめとし、技術的には、Real time PCR 法の基礎から、インフルエンザウイルス同定に必要なプライマーの検討法など実践的な講義であった。報告者は新しい遺伝子診断法の一つである Loop-mediated amplification method (LAMP) 法の原理について解説した。また、NIHE での H5 感染診断の責任者である Mai 博士による昨年からの H5 感染症に関する状況の概要報告があった。

D. 考察と結論

現在のベトナムにおける H5 感染診断技術は、当該国の状況を考えるとさほど劣っているとは思えない。しかし、現地担当者はパスツール研究所、NIHE ともに従来からインフルエンザウイルスをあつかっていた訳ではないのでインフルエンザウイルスに関する経験不足が診断結果に対する総合的な評価が不足す

ることにつながっていると考えられる。特に NIHE においては、実験設備に関してもほとんど問題が認められないくらい充実していた。しかし、一方で RT-PCR 技術や遺伝子情報の処理に関する経験が乏しいため、実験結果の正しい評価が行えず、また問題が生じた時の問題解決力に難点があると思われた。

パスツール研究所における担当者の経験不足はより著明であり、技術職員の大半が大学卒業すぐの職員であり、人材不足の感は否定できない。再検の結果 10 検体中 6 検体で陽性反応が認められたことは、最初に検査が行われた際の指導、監督が不十分であったことを示唆している。一方、以前 4 検体が陰性であったことは、パスツール研で行われている RT-PCR 法と感染研で行われている方法で本来の感度が異なっていることを示唆している。これは、パスツール研での方法は、ワンチューブ法による RT-PCR であるのに対し、感染研ではいったんインフルエンザウイルスに対するユニバーサルプライマーを用いて cDNA を作成した後に PCR を行う 2-ステップ法であることによる。先に触れたように、技術者の経験が未熟である場合には 2-ステップ法による RT-PCR は、クロスコンタミネーションを引き起こし擬陽性が多発する危険性がある。

パスツール研と NIHE の双方を訪問する機会を得て感じたのは、それぞれの研究所でそれぞれ異なった意味での経験不足による問題点を抱えているといったことである。H5 型インフルエンザウイルス感染という希少感染症であるため、経験者が少ないのは

世界中に共通した問題である。しかし、NIHE においては経験者は少ないが、十分な機材、施設に恵まれており、WHO の支援も適時行われておりあまり問題は生じないと考えられる。一方でパスツール研究所は機材、人材ともに不足気味であるが、全体として見ると診断技術の信頼性という面では、NIHE と遜色ないデータが得られているようだ。今後の支援の方向性として NIHE ではウイルスサーベイランスを指向する人材の養成が必要であり、パスツール研においては、資材、施設の充実が第一であろう。

F. 健康危機情報

特記事項無し。

G. 研究発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

高病原性鳥インフルエンザウイルスのネコに関する調査研究

分担研究者：山田章雄	国立感染症研究所獣医科学部	部長
協力研究者：棚林 清	国立感染症研究所獣医科学部	室長
小山雅史	京都府動物愛護管理センター	主任
森田憲行	京都府保健福祉部動物愛護管理室	副室長
堀田明豊	国立感染症研究所獣医科学部	研究員
宇田晶彦	国立感染症研究所獣医科学部	研究員
藤田 修	国立感染症研究所獣医科学部	研究員

研究要旨：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る。

A. 研究目的

2003 年 11 月からアジアを中心に、高病原性鳥インフルエンザ (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あり、死亡例を伴うヒトの感染が報告されている。本邦でも、4 件の家禽における発生があった。さらに、タイではイエネコ、トラやヒョウで H5N1 亜型ウイルスの感染が見られたことや、イエネコにおける本ウイルスの感染実験でネコが感受性であること及び、同居感染ならびに感染鶏を喫食することにより感染することが報告された。本研究ではイエネコの HPAI ウイルスの自

然界における存続や伝播に関与する可能性を検討するために、イエネコが HPAI 流行時に罹患した可能性があるか否かについて発生地域のネコの血清抗体の有無の調査を実施するとともに、ネコの本ウイルスへの親和性を調べることにより HPAI ウイルスの生態に関わるネコの役割の可能性を検証することを目的にした。

B. 研究方法

(1) 高病原性鳥インフルエンザ発生地域におけるネコ血清の収集

2004 年 3 月に発生した京都府内養鶏場か

ら半径 30Km 圏内で HPAI 発生時に飼養されていたと推定され、その後、所轄保健所に引き取られたネコの血液採取を、京都府および京都府動物愛護管理センターの協力を得て実施した。

(2) H5 亜型インフルエンザに対する血清抗体の測定

採取されたネコ血清について、H5 亜型インフルエンザウイルスに対する抗体の測定は赤血球凝集阻止 (HI) 試験で行った。血清は、RDE 法による処理を行い試験に供した。HA 抗原は不活化 H5N1 ウイルス液 (H5N1 virus A/HK213 xA/PR8 (7:1)、国立感染症研究所ウイルス三部より分与) を用いた。

(倫理面への配慮) ネコの血液採取に当たっては動物愛護を十分に配慮して行った。

C. 結果

(1) 高病原性鳥インフルエンザ発生地域におけるネコ血清の収集

2004 年 3 月に HPAI の発生した京都府丹波町内の大規模養鶏場から半径 30Km 以内の地域を所管する保健所に引き取られたネコで推定年齢が 1 歳以上の成猫を対象にした。2004 年 12 月から 2005 年 2 月までの間に 24 頭の成猫から血清を採取することが出来た。これらのネコは京都府瑞穂町、園部町、美山町、及び亀岡市において飼養されていたものであり、丹波町の検体は得られなかった。いずれのネコにおいても HPAI 発生時の健康状況は不明である。

(2) H5 亜型インフルエンザに対する血清抗体の測定

H5 亜型インフルエンザウイルスに対する HI 抗体の測定を実施したところ、血清希釈 10 倍においても明らかな赤血球凝集阻止反

応を示す検体は無かった。しかし、不完全な凝集阻止像を示すものがあり、HI 試験に供する血清の前処理法の検討が必要であることやウイルス中和試験などの他の方法による測定も必要であると考えられた。

D. 考察

H5 亜型インフルエンザによる HPIA の発生があったタイにおいてイエネコの感染があったことや本ウイルスの実験的感染でもカイネコで感染発症が成立することが報告されたことから、本邦における HPAI 発生時に周辺に飼養されていたイエネコが本ウイルスに罹患した可能性があるか否かを検証するために、周辺地域の成猫の血清の収集を実施し、H5 亜型インフルエンザに対する血清抗体の測定を試みた。24 頭の収集されたネコ血清では明らかな HI 抗体陽性反応像を示す検体は認められなかった。しかし、不完全な血球凝集阻止像を示す検体もあったことから、HI 試験法の精度を確実にするために通常用いられる RDE 法に換わり、トリプシン過ヨウ素酸法による血清処理を検討する必要があると考えられた。また、ウイルス中和試験法などによる抗体検出方法もあわせて実施する必要があると考えられた。

これまで報告されているネコやトラにおける感染事例や実験感染の結果は、感染鶏の摂食や密な接触があったことで罹患しており、今回の調査で収集されたネコが感染鶏の死体を摂食したり接触した可能性は低く、感染をした可能性は極めて低いと推定されることから直ちに公衆衛生上問題になるとは思われない。しかしながら、HPAI 発生農場の半径 30Km 圏内で 3 羽のカラスでの感染が認められており、カイネコがこれら

と接触する機会が皆無ではないことから、HPAI発生時には注意する必要があると思われる。また、ネコの鳥インフルエンザウイルスに対する親和性についてレセプター分子の解析やネコ由来細胞でのウイルス増殖性などの基礎的な実験による検証を行いネコの本ウイルス存続や伝播にかかわる程度を検証する必要があると思われる。

E. 結論

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。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あわせて検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし