

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告

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

分担研究者 小林 睦生 （国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長）
協力研究者 澤邊 京子 （同・昆虫医科学部 室長）
伊澤 晴彦 （同・昆虫医科学部 研究員）
星野 啓太 （同・昆虫医科学部 流動研究員）
佐々木年則 （同・昆虫医科学部 主任研究官）
林 利彦 （同・昆虫医科学部 主任研究官）
津田 良夫 （同・昆虫医科学部 室長）
倉橋 弘 （同・昆虫医科学部 客員研究員）
棚林 清 （同・獣医科学部 室長）
堀田 昭豊 （同・獣医科学部 研究員）
西藤 岳彦 （同・ウイルス三部 主任研究官）
山田 章雄 （同・獣医科学部 部長）

研究要旨

2004年2～3月、京都府丹波町で発生した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多数採集し、そ嚢および消化管のインフルエンザウイルスの検出と分離を試みた。その結果、オオクロバエとケブカクロバエの各20匹の消化管ホモジネートからA型H5亜型のMおよびHA遺伝子断片が検出され、HA遺伝子のアミノ酸配列にREERRRKKR↓Gの開裂部位を認めたことから、検出されたウイルスが高病原性A型H5亜型インフルエンザウイルスであることを確認した。個体別にウイルス検出を行ったところ、上記2種クロバエにおけるウイルスRNA検出率は10～30%と高率で、発生鶏舎より約2km地点で採集されたオオクロバエの10%がウイルス陽性であった。ウイルスRNA陽性オオクロバエの消化管ホモジネートを個体別に作成し、発育鶏卵に接種しウイルス分離を試みたところ、10個体中2個体のハエからウイルスが分離された。分離されたウイルス株の遺伝子3分節（HA, NA, M遺伝子）の全塩基配列解析から、本ウイルスがA型H5N1亜型インフルエンザウイルスであることが確認され、京都府丹波町船井農場鶏由来の分離株との間の塩基相同性からほぼ同一ウイルスとみなされた。

A. 研究目的

1997年に香港で流行したA型H5N1亜型高病原性トリインフルエンザは、本来鳥類のみが感染するタイプであるとみなされていたH5N1亜型インフルエンザウイルスが、ヒトへも重篤な感染・死亡例を引き起こす可能性があることを初めて示した事例であった。2003～2004年に山口、大分、京都の

計4箇所で発生した高病原性トリインフルエンザは、わが国では79年ぶりの流行であった。その流行がほぼ収束した時期の大分県九重町と、まさに鶏糞や鶏の死骸の処理を行っていた時期の京都府丹波町浅田農産船井農場付近にハエ類の採集に出向き、クロバエを中心とする数種ハエ類を採集した

ことは昨年の厚生科学研究報告書に記載した通りである。そこで本年は、採集したハエ類からのインフルエンザウイルスの検出と分離を試みた。ハエ類は腸管出血性大腸菌 O157 を始め、ポリオウイルスや寄生虫の虫卵など、様々な病原体を機械的に伝播することが知られている。本件では、ハエ体表がウイルスに汚染されている可能性を排除するため、まずハエを解剖し「そ嚢」および「消化管」を取り出し、ウイルスが存在しているかを調査した。以下、次の項目で研究を進めた。1) 野外採集ハエ類からの A 型 H5 亜型インフルエンザウイルス遺伝子 RNA の検出、2) マトリックスタンパク (M) およびヘマグルチニンタンパク (HA) 分節の遺伝子部分配列の解析、3) 発育鶏卵接種によるウイルス分離の試み、4) 分離株からの HA、M、NA (ノイラミニダーゼタンパク) 分節の全塩基配列解析。

B. 研究方法

1. ハエ類の採集

2004 年 2 月 24～25 日大分県九重町、3 月 9～12 日京都府丹波町浅田農産船井農場の周辺で、魚肉ベイト (鰯) に誘引されるハエ類の採集を行った。採集した個体は個別にマイクロチューブに入れ、冷蔵状態で感染研に輸送した。採集地点の詳細は図 1 に示した。

2. ウイルス分離

ハエの解剖：

ハエはリン酸緩衝液で体表を軽く洗浄後、ホールグラス上で解剖しそ嚢および消化管 (胃～中腸) を摘出した (図 2)。それらサンプルをリン酸緩衝液を加えたチューブに移し、細胞破碎機 MM300 (QIAGEN) で破碎後軽く遠心し、上清を RNA の抽出に供した。チューブ内に付着した排泄物および吐出物は少量のリン酸緩衝液をチューブ内に加え、軽く遠心後回収した。

ハエのそ嚢および消化管内容物 (チューブ内部から回収した吐出物、排泄物を含む)

は High Pure Viral RNA kit (Roche) により、そ嚢、消化管の組織ホモジネートは RNeasy Mini Kit (QIAGEN) により、RNA を抽出した。一連のすべての工程は安全キャビネットの中で行った。

遺伝子検出：

遺伝子検出に用いたプライマーは下記のセットである。

- 1) A 型インフルエンザウイルス検出用 (M 遺伝子, 231bp) : ウイルス三部より提供
TypeA/M30f :

TTCTAACCGAGGTCGAAACG

TypeA/M264r :

ACAAAGCGTCTACGCTGCAG

- 2) H5 亜型検出用 (HA 遺伝子, 708bp) :
感染研ホームページより参照

H5 515f : CATACCCAACAATAAAGAGG

H5 1220r : GTGTTCATTTTGTTAATGAT

反応は、48℃で 45 分→94℃2 分間熱変性させ、その後 94℃1 分→45℃1 分→72℃2 分のサイクルを 45 回繰り返した。その後 72℃10 分→4℃保管した。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンス法により PE/ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いて解析した。

ウイルス分離：

オオクロバエのそ嚢および消化管を摘出後、MEM 懸濁液を添加し細胞破碎機 MM300 によりウイルス乳剤を作成した。ウイルス乳剤は個別に A/H5 インフルエンザウイルス遺伝子の検出を行い、検査した 180 個体のうち 44 個体の陽性サンプルを選別した。このようにしてウイルス陽性を確認したサンプル中 10 サンプルをウイルス分離に供した。分離は発育鶏卵接種法を用い、1 サンプルを 3 個の鶏卵に各 0.2ml を接種し、3 日後尿漿膜腔液を回収した。ウイルス判定は HA テスト、flu A+B kit (Becton, Dickinson and Company) および RT-PCR 法で判定し、陰性サンプルについては 2 回目の継代を行った。

遺伝子解析：

分離されたウイルスのうち、増殖のよいものから Universal primers (Hoffmann *et al.*, 2001) および独自に作成したプライマーペアを用いて (配列情報は省略)、前述した条件で RT-PCR を行い、HA、M、NA 各分節の遺伝子を増幅した。遺伝子解析は PE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いて実施した。他の分離ウイルスとの塩基相同性は BLAST-search および GENETYX-WIN ver.5 を用いて解析を行った。

C. 結果

ハエ類からのインフルエンザウイルス遺伝子の検出：

大分県九重町採集のオオクロバエ、京都府丹波町 A 地点で採集されたオオクロバエ、ケブカクロバエ、オオイエバエおよびモモグロオオイエバエのそれぞれ 20 個体を 1 プールとしウイルス遺伝子を検出した。

京都府丹波町 A 地点で採集されたオオクロバエとケブカクロバエにおいて、M 遺伝子が各 2 プールすべてから、HA 遺伝子が各 1 プールずつから検出された (図 3)。大分県九重町採集のオオクロバエ、丹波町 A 地点オオイエバエおよびモモグロオオイエバエからは HA、M 遺伝子のいずれも検出されなかった。

PCR 産物が得られたことから A 型 H5 亜型インフルエンザウイルスであることが確認されたが、PCR 産物の遺伝子解析を行ない、HA 遺伝子のアミノ酸配列に REER-RRKKR↓G に開裂部位を認め、本ウイルスが高病原性であることも確認した (図 4)。また、本ウイルスの HA 遺伝子部分配列は、京都府丹波町浅田農産船井農場鶏由来分離株 A/chicken/Kyoto/3/2004 (H5N1) との間に 99.8% (662bp/663bp) の塩基相同性があった。

オオクロバエおよびケブカクロバエから個別別にウイルス検出を行った結果、オオクロバエのウイルス遺伝子保持率は

10-30%と高率で、トリインフルエンザ発生鶏舎より約 2km 地点で採集された個体の 10%がウイルス陽性であった (図 5)。また、ケブカクロバエにおいても 10-20%がウイルスを保有していた。

発育鶏卵摂取によるウイルス分離および遺伝子解析：

ウイルス RNA 陽性オオクロバエのそ囊および消化管ホモジネートを発育鶏卵に接種しウイルス分離を試みたところ、10 個体中 2 個体のハエからウイルスが分離された (詳細は省略)。また、分離されたウイルスの 1 株を用いた遺伝子 3 分節 (HA、NA および M 遺伝子) の全塩基配列解析から、本ウイルスが A 型 H5N1 亜型インフルエンザウイルスであることを確認した。船井農場鶏由来株 A/chicken/Kyoto/3/2004 (H5N1) との間の塩基相同性は 99.6-100%で、両者はほぼ同一であると判定した (図 6)。

D. 考察

2004 年 2~3 月、高病原性トリインフルエンザが発生した京都府丹波町周辺では、ウイルスの確認が行われた直後から、野鳥に対するウイルス汚染調査が行われた。船井農場から半径 30km の移動制限区域内で、農林水産省による防疫措置期間中に死亡したカラスが多数発見され、このうち京都府で 7 羽、大阪府で 2 羽からウイルスが検出されたが、その他の野生動物からはウイルスは検出されていない。本調査で、ハエ類からウイルスが検出されたことは国内外でも初めての報告である。本結果は、インフルエンザ流行時に、少なくとも鶏舎間においてクロバエ類がウイルスを伝播する可能性があることを示唆するものである。

ハエ類が様々な病原体、例えばポリオウイルスや七面鳥のコロナウイルス、腸管出血性大腸菌 O157 や条虫卵などを機械的に伝播することは報告されている。しかし、これまでの報告は主に夏に活動するイエバエ類による伝播の可能性を示唆するもので

あったのに対し、京都府丹波町でのトリインフルエンザ流行時期に活動していたハエは、冬のハエであるクロバエ類であった。このハエが、冬季に流行するインフルエンザとの間に何らかの関係があったとしても不思議ではない。

本調査で、オオクロバエのウイルス保有率がケブカクロバエよりも高いことが示されたが、これは体のサイズに比例していると考えられる。オオクロバエの体長は11～15mmと大型であるのに対し、ケブカクロバエは8～13mmで、前者の2/3程度の大きさしかない。つまり、そ嚢や消化管など、摂取した流動餌を蓄える器官全体の許容量も約2/3であると考え、ケブカクロバエのウイルス保有率がオオクロバエよりも低かったことは理解できる。

オオクロバエはハエ類の中では大型種に区分され、動物の死体や排泄物を好んで摂食する。その食餌がウイルスに汚染されていれば、そのウイルスを大量に取り込む可能性は高いであろう。また、オオクロバエは移動能力に大変優れており、東シナ海洋上の気象観測船での捕獲記録もあり、大陸から長距離飛翔してくることも示唆されている。取り込まれたウイルスがハエ体内で増殖しないまでも、比較的長時間保有されれば、ウイルスを保有した状態で少なくとも近隣の鶏舎間を行き来し、次の感染源となる可能性はあると思われる。

しかしながら、他のハエ類による疾病伝播はいずれも機械的伝播の域を出ておらず、本件においても、クロバエ類がどの程度トリインフルエンザの流行に関与するのか、現時点では明らかになっていない。したがって、今後はハエ体内でのウイルス保有時間を摂食実験により明らかにするとともに、飛翔距離の推定、特に食餌後の飛翔生理を加味し正確に評価することが必要である。

E. 結論

2004年2～3月、京都府丹波町で発生し

たトリインフルエンザの流行時に採集されたクロバエ類のそ嚢および消化管から高病原性A型H5N1亜型インフルエンザウイルス遺伝子が検出され、その10個体中2個体のそ嚢および消化管からウイルスが分離された。このウイルスは、京都府丹波町浅田農園船井農場鶏由来の分離株と間の塩基相同性がほぼ同一とみなされたことから、少なくとも、高病原性トリインフルエンザが丹波町で発生した当時のような状況下では、近隣の鶏舎間へのウイルス伝播にクロバエ類が関与した可能性が示唆された。しかしながら、この結果だけではクロバエ類がわが国の高病原性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には十分ではない。クロバエ体内でインフルエンザウイルスの力価がなくなるまでの時間やクロバエの飛翔範囲、クロバエと鶏との接触ルートなどに関してさらに研究が必要である。

F. 健康危険情報

トリインフルエンザが発生した鶏舎周辺で採集されたクロバエ類から高病原性トリインフルエンザウイルスが分離されたことから、発生鶏舎周辺でのハエ類の防除が重要であり、ウイルスの分散を防ぐことによりウイルスの変異を抑えることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

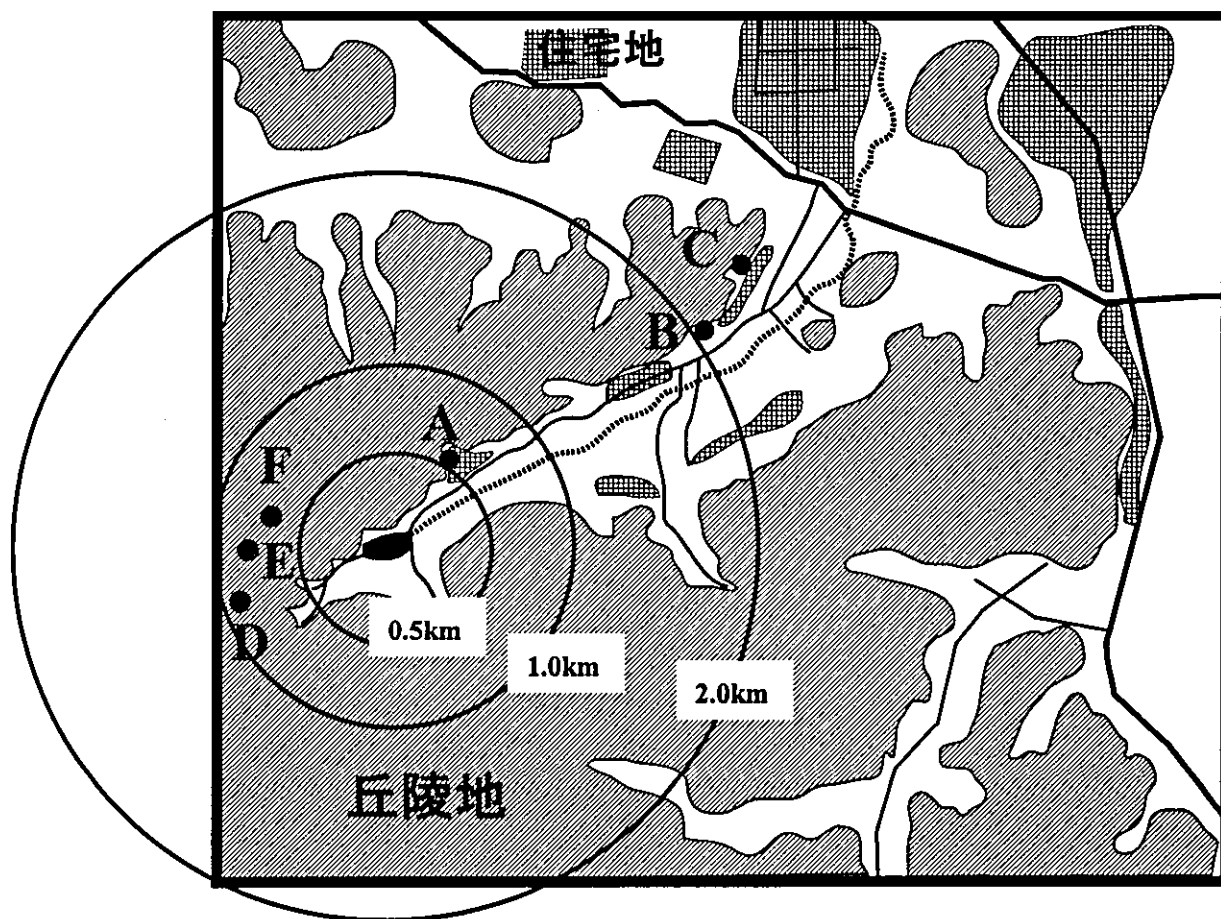


図1 京都府船井郡丹波町でトリインフルエンザが発生した養鶏場とハエ類の採集を行った場所(A-F)の位置関係

表 1. 京都府丹波町の養鶏場周辺で採集されたハエ類の種類構成
(調査期間 2004 年 3 月 10-11 日)

種 類	No	%
ケブカクロバエ	73	40.3
オオクロバエ	72	39.8
オオイエバエ	29	16
フタオクロバエ	2	1.1
モモグロオオイエバエ	2	1.1
オオセアカクロバエ	1	0.6
スネアカキンバエ	1	0.6
ヒロズキンバエ	1	0.6
全 体	181	100

表 2. 京都府丹波町の養鶏場周辺におけるオオクロバエの密度
(調査期間 2004 年 3 月 10-11 日)

採集場所	ハエ類密度/時間	オオクロバエの密度/時間 (推定値)	養鶏場からの距離 (m)
A	134	54	600
B	26	10	2,050
C	20	8	2,250
D	54	22	900
E	17	7	800
F	58	23	700
全 体	48	19	

表 3. 京都府丹波町および山口県阿東町の養鶏場周辺で採集されたハエ類の種類構成
(調査期間 2004 年 10 月 28 日-11 月 1 日)

種類	京都府丹波町	山口県阿東町	総計
オオクロバエ	367	711	1078
ホホグロオビキンバエ	40	16	56
コガネキンバエ	1	13	14
キンバエ	0	4	4
カガハナゲバエ	0	2	2
アシナガハリバエ	0	1	1
オビキンバエ	1	0	1
キアシフンバエ	0	1	1
センチニクバエ	0	1	1
タカネクロバエ	0	1	1
ツシマニクバエ	0	1	1
ブランコヤドリバエ	0	1	1
モモグロオオイエバエ	1	0	1
総 計	410	752	1162

表 4. 京都府丹波町および山口県阿東町の養鶏場周辺におけるオオクロバエの平均密度
(調査期間 2004 年 10 月 28 日-11 月 1 日)

	京都府丹波町		山口県阿東町	
	雌	雄	雌	雄
捕獲総数	271	31	230	9
採集時間	5	5	5	5
平均捕獲数/時間	54.2	6.2	46	1.8

表 5. 京都府丹波町および山口県阿東町で採集されたオオクロバエ雄の翅の破損度
(調査期間 2004 年 10 月 28 日-11 月 1 日)

破損度	京都府丹波町	山口県阿東町	総 計
1	0	0	0
2	0	1	1
3	4	3	7
4	23	84	107
5	13	104	117
総 計	40	192	232
平均破損度	4.2	4.5	

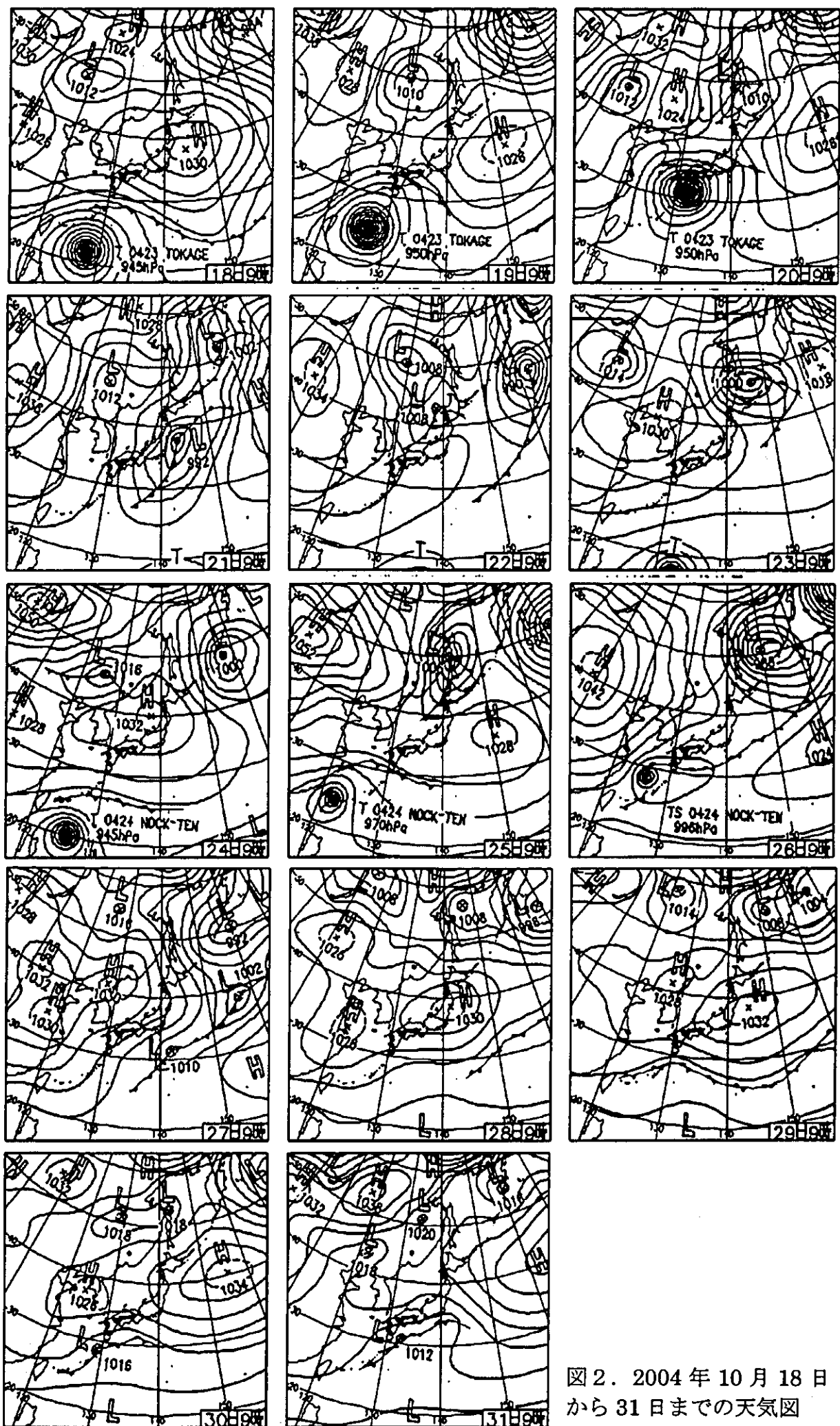


図2. 2004年10月18日から31日までの天気図

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 小林睦生 (国立感染症研究所 部長)
研究協力者 津田良夫 (国立感染症研究所 室長)
林 利彦 (国立感染症研究所 主任研究官)
倉橋 弘 (国立感染症研究所 客員研究員)
比嘉由紀子 (国立感染症研究所 リサーチレジデント)

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クロバエ類の現地調査を行った。2004年3月に京都府丹波町の養鶏場周辺で行ったクロバエ類の調査の結果、オオクロバエが高密度で生息していることがわかった（時間当たり密度は最高で54頭）。トリインフルエンザ流行の1年後に山口県阿東町と京都府丹波町で季節移動開始直後のクロバエ類の調査を実施した。これらの地域ではトリインフルエンザ流行後に養鶏場が閉鎖されていたにもかかわらず、3月に京都府丹波町で観察された密度とほぼ同程度の密度でオオクロバエが生息していることがわかった。オオクロバエ雄成虫の翅破損度を調べた結果、山口県阿東町の集団の翅破損度は平均4.5で京都府丹波町の集団翅破損度（平均4.2）よりも有意に大きかった。沖縄本島北部国頭村与那に12月下旬に設置したトラップで、雌雄各1頭のオオクロバエが捕集され、冬季に沖縄本島にも本種が分布していたことが確認された。

A. 目的

我国では2003年12月から2004年3月にかけて3ヶ所でトリインフルエンザの流行が確認され、そのうち2ヶ所は大規模養鶏場であった。京都府船井郡丹波町の大規模養鶏場での流行では、感染経路として渡り鳥やアヒル、野鳥の重要性が指摘されたが、感染が確認された野鳥はカラスだけであった。カラスの感染が確認されたことは、トリインフルエンザに感染・死亡した鶏やカラスの死体が放置され、野生動物が死体を摂食できる状況にあったことを示唆している。感染が起こった時期は12月から3月で冬季ではあるが、冬でも動物の死体や糞などを摂食するクロバエ類が知られている。クロバエ類が摂食によって死体や糞などから

トリインフルエンザウイルスを消化管内に取り込み、これを排泄物と共に排出するあるいは消化管にウイルスを持ったクロバエが鶏によって捕食されるなどの経路によって、クロバエ類が感染拡大に関与している可能性が考えられる。

トリインフルエンザが我国に持ち込まれた経路として中国北東部や朝鮮半島からの渡り鳥の重要性が指摘されているが、この問題に関してもオオクロバエは興味深い生態を有している。オオクロバエの新成虫は3月から5月にかけて羽化するがすぐに繁殖するのではなく、初夏に低地から冷涼な高地へと季節移動し秋まで高地で過ごす。その後低温や短日によって冬の到来を察知し、低地へ戻って繁殖を始める。このような季節移動は標高の

異なる低地と高地の間の垂直移動だけでなく、緯度的に異なる地域を南北に水平移動していると考えられており、10月末に朝鮮半島方面から西南日本へ長距離移動する個体が確認されている。これら長距離移動個体は何頭ぐらい飛来し日本列島のどの地域まで到達しているかは詳しく調べられていないが、オオクロバエがトリインフルエンザウイルスの運び屋となっていた可能性も考えられる。

オオクロバエの季節移動性や冬季の繁殖生態を考慮すると、毎年くり返されてきた独特の生活史の中に腐食者としての食物連鎖を通じてトリインフルエンザウイルスが取り込まれ、冬季の繁殖の過程でトリインフルエンザの流行に関与する機会が生まれたと考えることができる。このような仮説に基づいて、我国におけるトリインフルエンザの大流行にクロバエ類がどのようにまた、どの程度関与していたのかを明らかにするために、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クロバエ類の現地調査を行った。どちらの養鶏場もトリインフルエンザの流行が確認されて以降使用されていない。しかしながら2003年から2004年に起こったトリインフルエンザの流行が毎年くり返されてきたオオクロバエの生活史の上で展開されていたと考えれば、現在養鶏場が使用されていなくてもクロバエ類は前年と同じ地域に飛来し繁殖しているだろうと予想し調査を行った。

オオクロバエの長距離移動がはじまる時期と飛来先を明らかにすることは、オオクロバエによって海外からトリインフルエンザウイルスが運び込まれているかどうかを監視する上で非常に重要である。そこで長距離移動が開始される時期を知るために10月中旬から下旬にかけて福

岡で飛来個体の有無をモニタリングするとともに、これまでオオクロバエの生息がはっきり確認されていない沖縄本島での冬季のクロバエ類調査を行った。

B. 方法

クロバエ類の採集は腐りかけた魚肉を用いて成虫をおびき寄せ捕虫網で捕獲して行った。京都府丹波町では流行が確認された直後の2004年3月10、11日とオオクロバエの季節移動が開始される前後、10月21、31日、11月1日に実施した。山口県阿東町では福岡で季節移動個体が確認された1週間後の2004年10月28、29日に実施した。京都府丹波町の3月の採集では養鶏場からの距離が異なる6ヶ所で採集を行った(図1)。10月下旬から11月初めの調査では、養鶏場に近接した場所1ヶ所を固定して時間当たり採集を行った。またその周辺のもう1ヶ所を選びセイタカアワダチソウなどの訪花個体(主に雄)も合わせて採集した。採集された個体は1頭ずつチューブに入れそのまま冷凍して持ち帰った。雌成虫は分析用のサンプルとして種類を同定した後も冷凍で保存した。雄成虫を用いて翅の破損度を調べた。

沖縄本島でのクロバエ類調査は、国頭村与那の琉球大学演習林内に12月26日に予研式ベイトトラップを設置して行った。

C. 結果

京都府丹波町の採集地Aで採集されたハエ類の種類構成を表1に示した。全体で8種類が採集されたが、オオクロバエとケブカクロバエの2種類が全体の約80%を占め、これにオオイエバエを加えると全体の96%に達した。オオクロバエの時間当たり個体数を養鶏場周辺の6ヶ所で採集されたハエ類の時間当たり個体数と表1に示した種類構成から推定して

表2に示した。ハエ類が最も多く採集されたのは養鶏場に最も近い採集場所Aで時間当たり134頭であった。また、養鶏場からの距離が遠いほどハエ類の密度は低い傾向があり、養鶏場から2,250m離れた採集地Cでは時間当たり20頭であった。オオクロバエの時間当たり密度は最低で時間当たり7頭、最高で時間当たり54頭、全体では時間当たり19頭と推定された。

表3に2004年10月28日から11月1日に実施したクロバエ類の採集結果を示した。京都府丹波町では5種類、山口県阿東町では11種類のハエ類が採集された。どちらの調査地でもオオクロバエが多数採集され、構成割合は京都府丹波町では全体の90%、山口県阿東町では全体の95%に達した。気象条件がよかった日の採集結果に基づいてオオクロバエの平均捕獲数を求めたところ、京都府丹波町では時間当たり雌54.2頭、雄6.2頭、山口県阿東町では時間当たり雌46頭、雄1.8頭であった(表4)。雄の捕獲数が少ないのは採集に魚肉を用いたので雄が雌に比べて誘引されにくかったためであると考えられる。雌の平均捕獲数は京都府丹波町と山口県阿東町でほぼ同様でしかも、京都府丹波町で実施した3月の調査時の最高捕獲数(時間当たり54頭)と大きな差はなかった。

雄個体の翅破損度の頻度分布を表5に示した。翅破損度は1から5の段階に分けられ、1が最も軽微で破損度5が最大である。どちらの集団の翅破損度もかなり大きく平均破損度は4以上であった。山口県阿東町の集団の翅破損度は平均4.5で京都府丹波町の集団翅破損度(平均4.2)よりも有意に大きかった。

福岡でのモニタリングで2004年10月21日にオオクロバエの飛来が初めて確認

された。オオクロバエの飛来が始まる前の生息状況を調査するために京都府丹波町で採集を試みたが、あいにく10月19日から関西地方に台風が襲来し21日まで採集ができなかった。天候が回復した10月21日に数時間採集を実施したが、捕獲されたオオクロバエはわずか1頭だけであった。

沖縄本島北部国頭村与那に設置したトラップで、12月26日から1月28日間に雌1頭、1月28日から2月28日間に雄1頭が捕集され、冬季に沖縄本島にも本種が分布していたことが確認された。雌個体は体長15mm、翅破損度4、卵巣の発育ステージIII、交尾済みであった。雄個体は体長10mm、翅破損度1であった。

D. 考察

10月18日から31日の天気図を図2に示した。10月20日に台風が通過した直後にそれまでの東高西低の気圧配置から冬型(西高東低)の気圧配置に移行していることがわかる。21日以降全国的に高気圧に覆われ10月末まで晴れの天気が続いた。過去に行われた断片的な観察から、このような気圧配置の季節的な変化が大陸から西南日本への風を生じその風に乗ってオオクロバエの長距離移動が行われるものと推察されているが、2004年の移動もほぼ同じ経過をたどっていた。

オオクロバエの国内分布については、これまで北海道から鹿児島県沖永良部島までの記録がある。沖縄県についてはこれまで本種の分布が確認されていなかったが、今回の調査によって沖縄本島にも分布することが確認された。また、捕集された雌個体は体が大きく、翅破損が著しいことから、この個体が長距離移動してきた個体である可能性が高い。これに対して雄個体は体サイズがかなり小さく翅破損度も軽微であることから、沖縄本

島で羽化した個体の可能性が高く、沖縄本島だけで生活史を完了しているオオクロバエ集団が存在しているのかもしれない。

10月下旬から11月初めに調査した京都府丹波町と山口県阿東町でオオクロバエ雌の時間当たり平均捕獲数がほぼ同様でしかも、京都府丹波町で実施した3月の調査時の最高捕獲数（時間当たり54頭）と大きな差が見られなかったことは、トリインフルエンザが流行した2003年末から2004年初のオオクロバエの生息状況と2004年冬季の生息状況とがよく似た状況にあることを示唆している。両地域で養鶏場が閉鎖されまったく利用されていなかったことを考慮すると、恐らく養鶏場の存在はオオクロバエの繁殖にそれほど大きな意味はなく、オオクロバエが養鶏場を目指して飛来し繁殖していたわけではないと思われる。むしろオオクロバエが冬季生息場所として利用していた場所が、たまたま養鶏場の立地にも好適であったと考える方が妥当であると思われる。

オオクロバエは生態系の中で動物死体や糞などを摂食・分解する役割を担っている。したがって摂食活動を通してオオクロバエが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は極めて高いと考えられる。加えて飛翔能力が高く毎年朝鮮半島と西南日本の間で季節的な長距離移動をくり返しているとすれば、オオクロバエが海外からなんらかの病原体を運び込む可能性は常に存在しているといえる。このように長距離移動する昆虫によって病原体が運ばれる事例がどの程度存在するのかはほとんどわかっていない。今後このような観点からオオクロバエの生活史や病原体とのかかわりに関して多角的に調査研究する必要があるだ

ろう。

E. 結論

2004年3月に京都府丹波町でトリインフルエンザの流行が確認された養鶏場周辺でクロバエ類の調査を行った結果、オオクロバエの時間当たり密度が最低で7頭、最高で54頭、全体では時間当たり19頭であった。トリインフルエンザ流行の1年後に山口県阿東町と京都府丹波町で季節移動開始直後のクロバエ類の調査を実施した。これらの地域ではトリインフルエンザ流行後に養鶏場が閉鎖されていたにもかかわらず、3月に京都府丹波町で観察された密度とほぼ同程度の密度でオオクロバエが生息していることがわかった。したがって養鶏場の存在はオオクロバエの繁殖にそれほど大きな意味はなく、オオクロバエが冬季生息場所として利用していた場所がたまたま養鶏場の立地にも好適であったことが、オオクロバエとトリインフルエンザウイルスの関係を生じた背景となっていたと思われる。

2004年秋のオオクロバエの長距離移動は10月21日に福岡で確認された。今年度の長距離移動の開始は、過去の観察で示唆されてきたように、冬型の気圧配置への移行と対応していた。沖縄本島北部でオオクロバエ成虫2頭がトラップに捕集され、本種の分布が確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

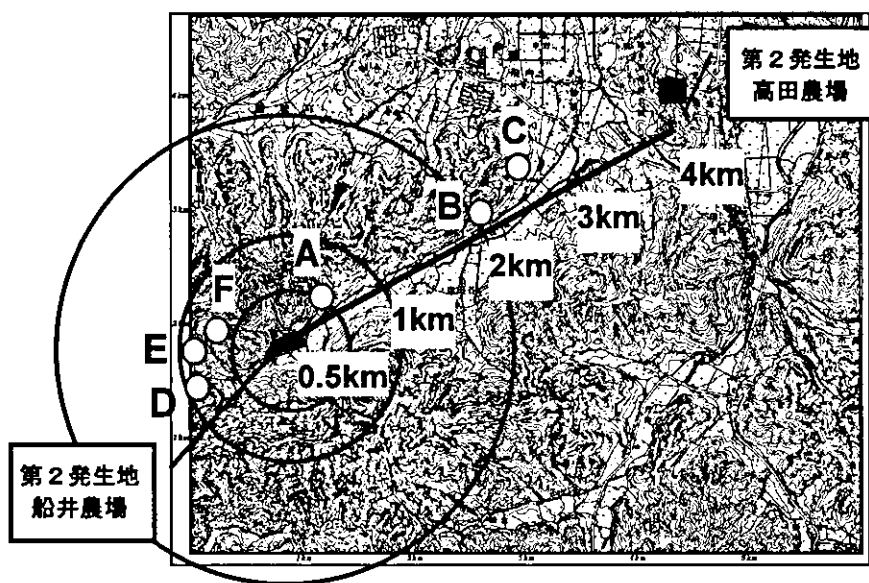


図1 京都府船井郡丹波町でトリインフルエンザが発生した養鶏場とハエ類の採集を行った場所(A-F)の位置関係

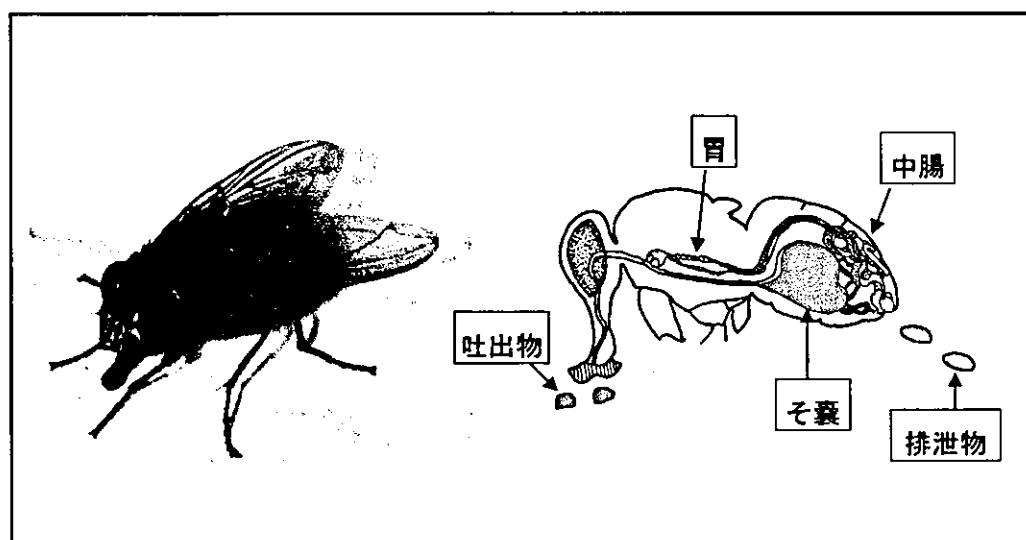


図2 オオクロバエ雌成虫（左）と食べ物を取り込んだハエの体内のようす（右）

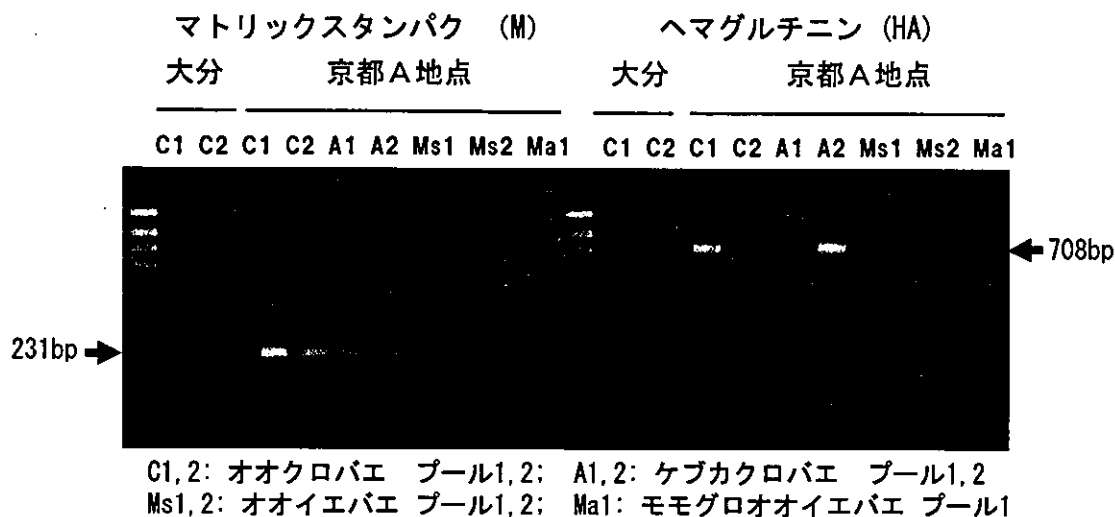
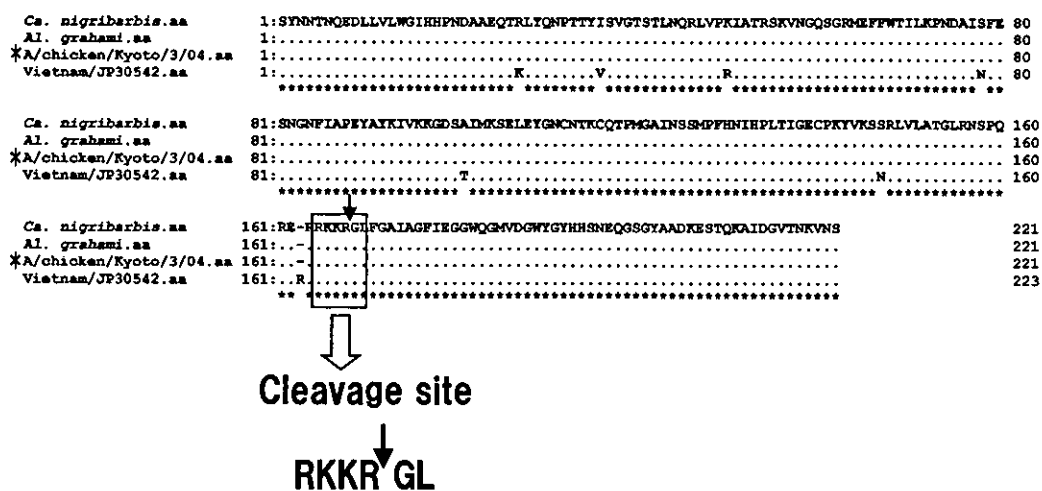


図3 RT-PCR によるウイルス RNA の検出



*京都府丹波町浅田農産船井農場鶏由来分離株 A/chicken/Kyoto/3/2004 (H5N1) (GenBankno. AB188824)

図4 2004年丹波町で採集されたオオクロバエおよびケブカクロバエの
HA 遺伝子部分アミノ酸配列

採集地点	種	n	ウイルス遺伝子陽性		
			そ嚢	腸管	個体数(%)
600-700m* A	オオクロバエ	10	1	2	2 (20)
	ケブカクロバエ	10	0	2	2 (20)
	オオクロバエ	10	2	3	3 (30)
	ケブカクロバエ	10	0	0	0
約2km* B	オオクロバエ	10	1	0	1 (10)
	ケブカクロバエ	10	0	0	0

*船井農場からの直線距離

図5 2004年丹波町で採集された2種クロバエにおけるA型H5亜型インフルエンザウイルス遺伝子保持個体

遺伝子 分節	A/chicken/Kyoto/3/2004 (H5N1) ^a との塩基相同性		Vietnam/JP3047/2004 ^b との塩基相同性
HA	99.9%	(1703bp/1704bp)	96.5% (1647bp/1707bp)
NA	100.0%	(1350bp/1350bp)	—
M	99.6%	(982bp/986bp)	—

^a 京都府丹波町浅田農園船井農場鶏由来分離株

(GenBank no. AB188824, AB189047, AB189048)

^b 2004年ベトナム人から分離された株(ウイルス三部より情報提供)

図6 丹波町A地点採集オオクロバエより検出されたインフルエンザウイルスの遺伝子比較

平成16年度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

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

分担研究者	田代眞人	国立感染症研究所ウイルス第3部部长
協力研究者	小田切孝人	国立感染症研究所ウイルス第3部室長
協力研究者	西藤岳彦	同 主任研究官
協力研究者	板村繁之	同 主任研究官
協力研究者	今井正樹	同 主任研究官
協力研究者	二宮 愛	同 研究者
協力研究者	佐藤征也	デンカ生研常務取締役
協力研究者	水野喬介	化学及び血清療法研究所部長
協力研究者	東 雍	阪大微生物病研究会理事長
協力研究者	駒瀬勝啓	北里研究所生物製剤研究所副所長
協力研究者	佐藤大作	厚生労働省医薬食品局血液対策課課長補佐

研究概要 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る。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認した。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。更に、新型インフルエンザの出現・大流行に備え、新型ワクチンの実用化、製造承認の取得を目標として、アルミアジュバント添加ワクチン製剤をGMP基準の下で試験製造し、非臨床試験を実施した。更に第1相+第2相臨床試験の計画を策定した。一方、インフルエンザウイルスは頻り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。

A. 研究目的

本研究は、H5N1型インフルエンザワクチンの緊急開発と製造承認・実用化を目的として、平成17年3月までに、アルミアジュバント添加ワクチン

の試験製造と前臨床試験を実施し、第1相+第2相臨床試験の計画を策定することにある。

現在、東アジアで流行中のH5N1高病原性鳥インフルエンザに由来する人の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いる。新型インフルエンザの大流行は、地球規模での大きな健康被害をもたらすとともに、社会的・経済的な損害さらには社会機能の麻痺・崩壊に至る事態が危惧される。これに備えて、わが国でも事前準備と対応行動計画の整備が進められているが、新型ワクチンの緊急開発・緊急増産は、新型インフルエンザ対策の切り札である。

我々は、高病原性ウイルスをリバース・ジェネティクス遺伝子操作によって弱毒化し、ワクチン製造用ウイルスを開発する技術¹を確立した。しかし、この技術を用いて作製した過去の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HAワクチンまたは以前使用されていた不活化全粒子ワクチン製剤では新型インフルエンザには対応できない可能性が示された。そこで、免疫賦活剤として人用ワクチンにも使用されている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、緊急開発の目的には現実的な解決方法であると判断した。

我々は、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基準により弱毒化ウイルスを作製した。臨床試験に使用するためには、GMP基準の下に、ワクチン製造用の種ウイルスの作製、およびアルミアジュバントを添加したワクチン製剤の試験製造が必要である。次に、この試験ワクチンを用いて前臨床試験および臨床試験を実施し、この新しい製法によるワクチン製剤に対する製造承認を得ておくことが、実際に新型インフルエンザ流行時における新型ワクチンの製造と使用において必須な作業である。これらは、わが国の新型インフルエンザ対策の中心である新型ワクチン政策の実施において不可欠な基盤を提供し、その成果はH5N1型のみならず全ての新型インフルエンザワクチンの緊急開発と実用化に応用されることとなる。この成果は、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健康危機管理に直接貢献するものである。

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、2004年初めのウイルスに基づいて開発した今回のワクチンが、現在および将来にわたって有効性を保つことは保証できない。常に流行しているウイルスの性状をモニターし、も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。そのためには、現在H5N1型ウイルス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必要がある。そこで、ベトナム・ホーチミン市のパスツール研究所と共同研究の契約を結び、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。現地でスクリーニングで陽性のものについては、ウイルス分離と詳細な性状解析のための共同作業を行うこととなった。

B. 研究方法

1. H5N1 新型インフルエンザワクチンの試験製造と非臨床試験

新型インフルエンザワクチンの開発に用いるリバース・ジェネティクス技術は金沢大の榎並や東大医科研の河岡らによって開発され、感染研をはじめ諸外国の研究所でも確立されている。H5N1型新型ワクチンの試験製造に関しては、GMP基準などの点から英国NIBSCのNIBRG-14株がWHO標準株と認定されており、我々もこれを用いた。

2004年2月に、WHOの依頼に応じて、ベトナム患者からの分離ウイルスを基に、リバース・ジェネティクスを用いて弱毒ウイルスを緊急開発した。しかし、感染研のBSL3実験室はGMP基準ではないために、我々の開発した株はWHOの新基準には適合していなかった。そこで、WHO標準株NIBRG-14を用いた抗原解析、弱毒化検証、製造効率等を検討し、ワクチン試験製造の基礎的な準備を整えた。感染研には現在GMP基準を満たす実験室が無いために、臨床試験および実用化のためのワクチン製造候補株の製造および試験ワクチンの製造を、これらの設備を備えた国内メーカーに委託して、全粒子不活化ワクチンにアルミアジュバントを添加または無添加のワクチン製剤を製造した。

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した。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った。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、その徹底を図った。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

策を講ずることとした。

これらの試験ワクチンについて、動物を用いた非臨床試験を三菱安全化学研究所に委託し、GLP管理のもとで、試験を実施した。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た。また動物に苦痛を与えないような方策をとった。

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、計画を策定した。

2. ベトナムにおけるH5N1型ウイルスの性状に関する継続的モニター

ホーチミン市パスツール研究所で採取した患者検体約100検体について、共同で遺伝子診断を行った。また送付された検体についてウイルス分離を行い、抗原解析、遺伝子解析、薬剤感受性、ワクチン感受性等について解析を行った。

C. 研究成績

1. H5N1 新型インフルエンザワクチンの試験製造と非臨床試験

本計画の全ての過程は、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GLP、GMP、GCPに準拠した施設・方法で行われた。

1) 新型ワクチン製造株の開発製造

NI BRG-14株について、発育鶏卵および動物における弱毒化の検証を行った。更に遺伝子塩基配列を決定し、遺伝的安定性および弱毒性の遺伝子マーカーを確認した。また、抗原解析を行い、原株と抗原性が一致していることを確認した。

次に、国内4メーカーに委託して国内マスターシード候補株を作製した。その各々について、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した。

2) 試験ワクチンの製造

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った。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た。

3) 試験ワクチンの品質管理

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、品質管理を行った。

4) 試験ワクチンの基礎試験

試験ワクチンについて、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確性を可能な限り広い範囲で検証した。

5) 動物を用いた非臨床試験の実施

GLPを満たす専門検査施設において、試験ワクチンの非臨床試験を行った。試験項目については、総合機構、審査管理課、血液対策課と協議・調整中し、可能な限り多くの試験を実施しておくこととなった。

6) 非臨床試験の成績評価

前臨床試験の成績を評価し、臨床試験計画の検討材料をまとめる作業は、引き続き進行中である。

7) 臨床第1相+第二相試験の試験計画の策定

平成17年度後半に予定されている臨床試験の実施計画について、これまでの成績、海外の成績と情報等を基に、治験責任者、新機構、審査管理課、血液対策課、結核感染症課等と検討を行い、臨床試験実施計画の策定を進めている。

2. ベトナムにおけるH5N1型ウイルスの性状に関する継続的モニター

ホーチミン市パスツール研究所とインフルエンザに関する共同研究の契約を締結した。当該研究所には、BSL3の実験室が設置されていないために、BSL3に属するH5N1高病原性ウイルスを取り扱うことが出来ない。そこで、パスツール側は、インフルエンザ患者から臨床検体を採取収集し、これについて、RT-PCR法によるウイルス遺伝子診断を行った。陽性検体および不確定検体については、感染研と共同で再試験を行うと共に、ウイルス分離、抗原解析、遺伝子解析を行い、成績を共有して検討した。その結果、2005年3月の時点で、ベトナム南部で流行中のウイルスは、昨年初旬の流行ウイルスとほとんど変化しておらず、分離されたウイルスはすべてトリ型のレセプター特異性を持ち、ヒト型ウイルスとの遺伝子交雑も起こっていなかった。一方、アマンタジン耐性の性状も保持しており、対策の幅は狭まったままであった。

2004年1月のベトナムで分離株に基づく現在開発中のワクチン株については、ウイルス株の変更を検討する必要はないことが明らかになった。

D. 考察

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いる。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、これは抗原量を3倍に増やした現行のHAワクチン製剤である。従って、アジュバントを添加したH5N1型ワクチンに対する試験製造と臨床試験の計画は、現時点では日本だけである。

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、多国籍営利企業である欧米メーカーにおいては実施不可能であり、我が国の危機管理体制に対して、WHOをはじめ多くの国が注目している。

我々は、任意にウイルスを改変・作製できるリバース・ジェネティクス技術（第2，3版）を確立するとともに、2003年には香港で患者から分離されたH5N1型ウイルスについて、ワクチンを開発した。このワクチンも1997年のワクチン同様に免疫原性が低かったので、アルミアジュバントを添加したワクチンを試作して、動物レベルでの効果を調べ、アルミアジュバントの免疫増強効果と抗原節約効果を証明した。この様な基盤の確立と共に、国の主導による各社が協力する国内全体の統一した計画の実施は、緊急危機対応において非常に能率の良い計画実施として評価できる。

今後は、この成績に基づいて、アジュバントおよび抗原量を決定すると共に、第1+2相臨床試験を速やかに実施して、新型インフルエンザワクチンに対する製造販売承認を申請することになる。

E. 結論

H5N1型鳥インフルエンザの流行拡大から新型インフルエンザ出現が危惧されている。この事態に対する緊急危機対応として、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。これを用いて、GMPおよびBSL2+の基準の下で、

アルミアジュバント添加不活化全粒子ワクチンを試験製造した。新型ワクチンの実用化、製造承認の取得を目標として、GLPの下で非臨床試験を実施し、更に第1相+第2相臨床試験の計画を策定した。また、流行ウイルスの変異を監視するために、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。その結果、2005年3月現在、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かった。

F. 健康危機情報

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

- ・WHO: National and International Measures Before and During Influenza Pandemic, 2005
- ・WHO: Influenza Pandemic Preparedness Checklist, 2005
- ・Guidance for the timely sharing of influenza viruses/specimens with potential to cause human influenza pandemics, 2005
- ・Availability of H5N1 prototype strains for influenza pandemic vaccine development, 2005
- ・WHO Guideline for the development of reverse-genetics based influenza vaccines, 2004
- ・Estimating the impact of the next influenza pandemic: enhancing preparedness, 2004
- ・Assessment of risk to human health associated with outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in poultry, 2004
- ・厚生労働省: 新型インフルエンザ対策小委員会報告書, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし