

換えインフルエンザウイルスを作製することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Influenza B virus requires BM2 protein for replication. *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5576-83.

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.* 2004 Jun 2;22(17-18):2244-7.

Horimoto T, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Kawaoka Y. Influenza A viruses possessing type B hemagglutinin and neuraminidase: potential as vaccine components. *Microbes Infect.* 2004 May;6(6):579-83.

Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;283:43-60.

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol.* 2004 Sep;78(18):10149-55.

Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, Kawaoka Y. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet.* 2004 Aug 28;364(9436):759-65.

Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, Suzuki H, Nishimura H, Mitamura K, Sugaya N, Usui T, Murata T, Maeda Y, Watanabe S, Suresh M, Suzuki T, Suzuki Y, Feldmann H, Kawaoka Y. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature.* 2004 Oct 7;431(7009):703-7.

Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology.* 2005 Feb 5;332(1):167-76.

Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding Regions of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient Incorporation into Virions. *J Virol.* 2005 Mar;79(6):3766-74.

2. 学会発表

河岡義裕、インフルエンザ、日本感染症学会(東京)、2004年4月6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、A型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必要な領域、第137回日本獣医学会、(藤沢)、2004年4月4日

村本裕紀子、高田礼人、藤井健、野田岳志、岩附(堀本)研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕、Identification of the regions important for virion incorporation of PB2, PB1, and PA vRN A segments of influenza A virus. The Awaji International Forum on Infection and Immunity (兵庫県淡路島)、2004年8月30日

山田晋弥、藤井健、伊藤睦美、堀本研子、田川優子、高田礼人、五藤秀男、城野洋一郎、堀本泰介、河岡義裕、H5N1 インフルエンザウイルス山口株の弱毒改変型HAをもつワクチンの化血研 VERO 細胞を用いての試作、第138回日本獣医学会(札幌)、2004年9月11日

岩附(堀本)研子、前田潤子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルス M2 蛋白質の細胞質領域とウイルス粒子形成、第138回日本獣医学会(札幌)、2004年9月11日

河岡義裕、インフルエンザ：その制圧は？、第77回日本生化学学会(横浜)、2004年10月14日

河岡義裕、新型インフルエンザウイルス、第45回熱帯医学会大会(東京)、2004年10月16日

堀本泰介、河岡義裕、Influenza vaccines by reverse genetics. First China-Japan Bilateral Symposium on avian Influenza (China)、2004年10月18日

河岡義裕、Influenza pathogenesis、第1回中日鳥インフルエンザシンポジウム（北京）、2004年10月18日

河岡義裕、Why Influenza Kills ... and will Kill Again、44TH ICAAC(U.S.A.)、2004年10月30日

山田晋弥、新矢恭子、高田礼人、五藤秀男、鈴木隆、鈴木康夫、堀本泰介、河岡義裕、鳥インフルエンザウイルスの宿主域変化におけるウズラの役割、第3回感染症若手研究者沖縄フォーラム（沖縄）2004年11月6日

藤井健、岩附（堀本）研子、堀本泰介、河岡義裕、シークエンス・トラップ法を用いたインフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングシグナルの解析、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2004年11月21日

岩附（堀本）研子、野田岳志、渡辺真治、村本裕紀子、藤井健、前田潤子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルス M2 蛋白質の細胞質領域とウイルス粒子形成、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2004年11月21日

堀本泰介、藤井健、山田晋弥、伊藤睦美、岩附（堀本）研子、坂井（田川）優子、高田礼人、五藤秀男、城野洋一郎、河岡義裕、H5N1 インフルエンザワクチン候補株の Vero 細胞を用いての試作、第52回日本ウイルス学会（横浜）、2004年11月21日

木曾真紀、三田村敬子、坂井（田川）優子、白石京子、川上千春、菅谷憲夫、河岡義裕、小児におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現、第52回日本ウイルス学会（横浜）、2004年11月22日

河岡義裕、インフルエンザウイルスの謎、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2004年11月22日

河岡義裕、Why Influenza kills...and will kill again、第34回日本免疫学会（札幌）、2004年12月2日

藤井健、岩附（堀本）研子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングに必要な塩基配列、第27回日本分子生物学会、2004年12月10日

堀本泰介、藤井健、渡辺真治、前田寧子、河岡義裕、インフルエンザウイルスベクターの構築と展望、第27回日本分子生物学会（神戸）、2004年12月11日

河岡義裕、インフルエンザウイルスの謎、第27回日本分子生物学会（神戸）、2004年12月11日

堀本泰介、河岡義裕、鳥インフルエンザウイルスの人への感染メカニズム、平成16年度学会年次大会（合同学会：日本産業動物獣医学会、日本小動物獣医学会、日本獣医公衆衛生学会）（新潟）、2005年2月11日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

サーベイランスと危機管理体制の検討

分担研究者	岡部信彦	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	谷口清州	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	木村幹男	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	多屋馨子	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	大山卓昭	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	砂川富正	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	中島一敏	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	重松美加	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	大日康史	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	森兼啓太	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	田中政宏	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	多田有希	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	山下和予	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	斎藤剛仁	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	新井 智	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	佐藤 弘	国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨 何時かは誰にもわからないが、確実にやってくるであろうパンデミックに対して、世界は準備を進めつつある。特に、2002～2003年のSARS流行に引き続いて起こった、一連のアジアでの高病原性トリ型インフルエンザのヒトへの感染事例により、より切迫した問題ととらえられ、ここに至っては先進工業国のみならず途上国においても準備が進められつつあり、世界中でパンデミック対策が加速度的に進行している。パンデミックは単なる医学だけの問題ではないし、ワクチンとか抗ウイルス薬だけの問題でもない。社会全体の問題として、社会全体で取り組み、十分詳細な、包括的な対策を計画しておく必要があるのである。

A. 研究目的

20世紀におけるインフルエンザの世界流行（パンデミック）は、1918年スペインかぜ、1957年アジアかぜ、1968年香港かぜが記録されており、スペインかぜでは全世界で2000～4000万人が死亡したと考えられている。それ以前では、1847年と1889年にパンデミックが記録されており、それぞれのパンデミックの間は、42年、29年、そしてスペイン

かぜからアジアかぜまでの期間は39年であり、それから香港かぜまでは11年であった。これ以来36年間パンデミックは起こっていないが、インフルエンザに関する科学的知見が蓄積されるにつれ、再びパンデミックがおこることが懸念され、1993年にはドイツでの第7回ヨーロッパインフルエンザ会議、また1995年に米国でのパンデミックインフルエンザ会議での報告をはじめとして、多くの専門家から

「人の世界において流行する新型インフルエンザウイルスが早ければ数年のうちに出現する」との警告が出されていた。

これらを受けて世界各国がパンデミック対策に取りかかりつつあった状況下、1997年と1999年にそれぞれトリ型のインフルエンザである、A/H5N1型とA/H9N2型のインフルエンザのアウトブレイクが香港で勃発し、世界中でパンデミックへの進展が危惧されたが、このときにはWHOを中心とした世界中の支援により香港当局が精力的な対策を行い、鎮静化に成功した。このころより各国ではパンデミック対策は加速し始め、2002～2003年の重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome: SARS）の世界同時多発、同時期に発見された香港でのA/H5N1型インフルエンザウイルス感染、オランダにおいてはA/H7N7型インフルエンザのニワトリおよびヒトにおけるアウトブレイクが報告され、そして、2004年には、アジア地域で多数報告されたA/H5N1型の家禽におけるアウトブレイクとヒトへの感染を経て、現状ではパンデミック対策は、きわめて差し迫ったこととして、世界各国で準備が進められている。

本研究では、これまでに世界保健機関をはじめとして、世界各国で議論され、また出版されたパンデミックに対する事前準備に対する情報を収集し、また国内での状況を勘案して、国内における体制について検討し、最終的に国内におけるパンデミック事前準備について技術的な側面からプランを策定することを目的とする。

B. 研究方法

これまでに世界保健機関から出版された、パンデミックプランに関する勧告、世界各国、ここでは特に米国、英国、カナダ、オーストラリアにおいて作製されたパンデミックプランを検討し、またこれまで行われてきたインフルエンザパンデミックに関する国際会議での議論と私的通信による情報収集をもとに、これまでシーズン毎に行われてきたインフルエンザに関わるサーベイランス、インフルエンザ総合対策や、臨床の現場で行われている迅速診断キットの使用状況あるいは抗ウイルス薬による治療状況などを踏まえ、日本国におけるパンデミックプランの基礎とするために、今年度はパンデミックプラン

のマトリックスを作製した。プランを作製するに当たり、日本における被害状況の予測としては、米国CDCのFlu Aid 2.0、あるいはFluSurge 1.0による推計、また、スペイン風邪当時の日本の内務省統計の数字を参照し、最終的に、数理モデルにより、数種類のシナリオを設定して推計し、これを具体的なプランの参考とした。また、この経過において、WHOが出版している各国におけるパンデミックプランのチェックリストを邦訳した。また、厚生労働省は国としての「新型インフルエンザ対策報告書」を2004年8月に出版しているが、本研究班では純粋に技術的な側面からの検討であり、国際的な対応プランを標準として議論を進めているため、若干の違いが生じているが、厚生労働省の報告書は全体の考え方についての報告書であり、技術的な側面から検討を行った本研究とは矛盾を生じない。

C. 研究結果

今回の研究に関して検討対象としたのは、章末に上げる文献及び報告書であり、これらの内容を検討した。各国のプランは、内容的に多彩であり、温度差も感じられたが、これらに加えて、WHOの勧告を参照し、またG7+Mexicoで形成されているGlobal Health Security Action Group (GHSAG)での議論、WHOの主催するパンデミックプランに関する国際会議における議論、あるいはフロアにおける各国担当者との会談により、日本の国内状況を鑑みて、Reasonable and Feasibleと考えられるレベルでまず、マトリックスを作製した。プランはPhased approachによりレベル分けして行い、国際的な標準に従って、WHOの勧告するパンデミックフェーズを使用した。マトリックスは、添付書類（1）にまとめてある。また邦訳したWHOのパンデミックプランチェックリストは添付書類（2）に示す。

検討対象文献一覧

- 1) WHO. Influenza pandemic preparedness plan. The role of WHO and guidelines for national or regional planning. Geneva, Switzerland, April 1999. available at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_EDC_99_1/en/
- 2) WHO. WHO Guidelines on the Use of Vaccines and Antivirals during Influenza Pandemics. available at

http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_RMD_2004_8/en

3) WHO. WHO consultation on priority public health interventions before and during an influenza pandemic. available at

http://www.who.int/entity/csr/disease/avian_influenza/consultation/en

4) WHO. WHO checklist for influenza pandemic preparedness planning. WHO/CDS/CSR/GIP/2005.4 available at

http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_4/en

5) CDC. Pandemic Influenza: A Planning Guide for State and Local Officials version 2.1 available at

<http://www.dhhs.gov/nvpo/pubs/pandemicflu.htm>

6) DHSS. Pandemic Influenza Response and Preparedness Plan. available at

<http://www.hhs.gov/nvpo/pandemicplan/>

7) UKDH. Multiphase contingency plan for pandemic influenza. available at

<http://www.dh.gov.uk/assetRoot/04/05/05/48/04050548.pdf>

8) HPA. The PHLS plan for pandemic influenza. available at

<http://www.hpa.org.uk/infections/publications/pdf/pandemicplan.pdf>

9) Health Canada. Canadian pandemic influenza plan. available at <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/cpip-pclpi/>

10) Australian Department of Health and Ageing. A Framework for an Australian Influenza Pandemic Plan. Communicable Diseases Intelligence Technical Report Series No 4. available at

<http://www.health.gov.au/pubhlth/strateg/communic/tech/influenza.htm>

D. 考察

WHO でのパンデミックに対する事前準備は、基本的に Global Influenza Programme が中心となって、段階的に進められているが、これまで 1999 年 4 月に、Influenza pandemic preparedness plan. The role of WHO and guidelines for national or regional planning. Geneva, Switzerland, April 1999 を発表し、まずパン

デミックをいくつかの段階に分けて、それぞれのレベルにおいて WHO が何をすべきかについて述べ、続いて世界各国に対して、National Pandemic Planning Committee を樹立し、Pandemic に際して考慮すべきことをリストアップして、各国で Pandemic Plan を策定することを勧告している。

パンデミック対策においてはインフルエンザワクチンと抗インフルエンザウイルス薬が必要不可欠な要素となることは疑いない事実であるが、現実的にはほとんどの国では全く手に入らないか、あってもきわめて限定的な量であることが予想される。きわめて限定的な量のワクチンあるいは抗ウイルス薬の使用原則を決定するという事は、すなわち誰に使用するかという優先順位を決定することに他ならず、これはきわめて困難な作業であることはいまでもない。WHO はまず、目標を設定して優先順位を考えることを提言している。目標としては、死亡率を減少させる、罹患率を減少させる、社会機能の破綻を最小限に抑える、医療システムの維持、社会基盤の維持、経済的損失を最小限に抑えることなどを例示しているが、目標を設定すれば、同時に対象人口というのも想定されるわけである。この場合には、優先とする対象を設定した場合の社会的、経済的、政治的、倫理的、あるいは健康上の影響を考慮することが重要である。また、上述のすべての目標を同時に達成することはきわめて難しいことが予想されるので、目標自体も優先順位をつけられなければならないが、またこれはパンデミックの進行と疫学状況、すなわち、誰が罹患し、誰が死亡するかによって大きく影響をうける。故にこのような議論を行うためには、どのような人口が罹患し、それぞれの場合の社会的、経済的、あるいは健康上の影響としてのパンデミックのインパクトと対策の結果を、種々のシナリオを想定した上で、数理モデル等により推定することも必要であると考えられる。

パンデミックプランの目的は、パンデミックの出現時に速やかに押さえ込むこと、流行の拡大を遅延させること、そして死亡率、罹患率、社会機能の破綻を減少させることであるが、これを達成するためには、各パンデミックフェーズに応じて、サーベイランス、公衆衛生学的介入、抗ウイルス薬、ワクチンの4つの大きな問題について議論を行う必要がある。いうまでもなく、パンデミックがいったん起こ

り始めれば、これを止める手だては存在せず、可能な限り早期に不自然な疾患クラスタや新型コロナウイルスのヒト-ヒト感染を探知して、対策に当たることが、パンデミックの国内あるいは国際的な拡大を防ぐ唯一の機会であり、ヒトおよび動物におけるサーベイランスを強化することがきわめて重要である。すなわち、パンデミックのレベルごとに行うべきサーベイランスを設定することは極めて重要である。また介入については、パンデミック開始当初は科学的なデータがほとんどなく、その意志決定はきわめて難しいことを認め、迅速な調査結果を共有することにより柔軟に対応しなければならず、当然の事ながらワクチンあるいは抗ウイルス薬が入手できるまでの間は、患者隔離、接触者管理、あるいは学校の閉鎖などのヒトの多数集まることを中止するといった非医学的介入（Non-medical interventions）を考慮せざるを得ない。抗ウイルス薬はワクチンが利用可能になるまでは唯一のインフルエンザ特異的な医学的介入であるが、限定的な供給量をもっとも大きな問題であり、パンデミック時における抗ウイルス薬使用の優先順位という倫理的なジレンマは大きな問題である。現時点では備蓄がパンデミック時の供給を確保する唯一の方法であるが、これとて容易なことではない。ワクチンは通常期、パンデミック期をを通過してもっとも重要な対策方法であることは疑いない事実であるが、最初のワクチンの生産までには、新しいウイルスが分離されてから少なくとも4～6ヶ月はかかる。また世界中での製造能力は世界人口の10%に満たないこと、パンデミック用のワクチン生産には開発から、臨床試験から認可、生産、配布、集団接種やその製造物責任にいたるまでに種々の問題が予想されており、これらを解決するためには国際的な努力も必要である。ワクチンについても抗ウイルス薬と同様、各国において、初期の限られた供給量の際の優先順位と、供給の増加に伴いどのように接種対象を広げていくかの戦略を策定することが勧奨されている。

この様に考えてくると、いろいろなシナリオ想定においてプランを考えて行かざるをえないが、実際には発生してみないとわからないことが多々存在する。パンデミック間期のインフルエンザ対策は、サーベイランスに始まり、サーベイランスに終わると言われるが、パンデミックであってもサーベイラン

スにより迅速に情報を把握し、それに応じたアクションをとることが極めて重要と考えられた。

E. 結論

世界では、現在インフルエンザのパンデミックは、将来起こるというものではなく、すでに切迫した問題であるという認識になりつつある。一旦拡大をはじめれば、これを止めることは極めて難しいこともコンセンサスとなっており、目標は、可能な限り早期に探知して、拡大を防止する最大限の努力を行うこと、防止できないとしても、いかに拡大を遅らせるか、時間を稼ぐことができるかということにある。時間を稼げれば稼げるだけ、ワクチンや抗ウイルス薬の製造量を増加させることができるし、それらの恩恵にあずかれるヒトが増えるわけであり、有効な対策をとれることになり、そしてそれは、パンデミックの進行にとまらぬ、死亡率、罹患率、そして社会の破綻を最小限に食い止めるというもっとも大きな目標につながっていくわけである。

パンデミック対策は単にワクチンの製造や抗ウイルス薬の備蓄だけの問題ではない。これらの戦略的な使用方法を含め、サーベイランス、公衆衛生対応、医療機関での対応と、適切な医療の提供、社会基盤の維持とリスクコミュニケーションなどを含んだ包括的な対策を計画することと、そして大切なことは計画について事前に関係機関と十分なコンセンサスをとっておくことと、そして国民に対してもパンデミックに対する知識とともに情報提供しておくことである。このためにも、詳細なプランを策定しておき、いざ、パンデミック発生時になったら、状況に応じたプランを実施することが肝要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表 特記事項無し
2. 学会発表 特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 特記事項なし
2. 実用新案登録 特記事項なし

添付文書

- (1) 本邦におけるパンデミックプランマトリックスドラフト
(本報告書 P.66)
- (2) WHO パンデミックチェックリスト邦訳版
(本報告書 P.84)

新型インフルエンザ診断系の開発、海外流行地への
診断技術支援と国際協力に関する研究

分担研究者 小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室室長
協力研究者 今井正樹、二宮愛、小淵正次、西藤岳彦、板村繁之
(国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室)
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 one-step RT-PCR 法の改良により、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、東南アジア諸国から実験室診断担当者を感染研に招聘して診断技術のトレーニングを行った。また、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検証を行い、診断系の信頼性向上に努めた。

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。現在、ベトナムやカンボジアでは第 3 波の流行の中にあり、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。このような事態に対応するために、感染研を含む WHO-H5 ウイルスレファレンスセンターネットワークでは、2004 年のヒト分離株からリバースジェネティクス法（RG 法）により弱毒化 H5N1 ワクチンを開発し、製造承認の取得と実用化へ向けての開発研究を進めている。

一方、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。

本研究では、現行の RT-PCR の変更による感度の改良および新たに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を目指して研究を行なった。また、それらを用い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。さらに、H5N1 ウイルスの流行国への国際貢献として、流行地から実験室診断担当者を感染研に招聘して診断技術のトレーニングを行った。また、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を行った。

B. 研究方法

1 H5N1 ウイルス検査

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。

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、感染研情報センター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 H5N1 鳥分離株に対する H5-LAMP の感度検討。

インドネシアや中国の鳥から分離された H5N1 ウイルスは系統樹解析では東南アジア諸国のヒト分離株とは異なる分枝に分類される。これらのウイルスに対する H5-LAMP システムの感度はヒト分離株の約 1/100~1/1000 であった。そこで、これら遺伝的に異なるウイルスも高感度に検出できるようにプライマーの一部を再設計した。その結果、ヒト分離株のみならず鳥分離株に対しても高い感度を示す LAMP システムの改良に成功した。

4 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 9 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 ネットワーク間で共有され、WHO のパンデミックワクチン株は変更しないことが確認された。

5 海外流行地域に対する技術支援

- 感染研における株サーベイランスワークショップの開催。

東南アジア諸国、インドおよびモンゴルにおけるインフルエンザ株サーベイランス体制の構築および活性化を図るために、当該国の実験室担当者、疫学担当者各1名ずつを感染研に招聘し、4泊5日の日程でトレーニングワークショップを開催した。本コースでは実験室担当者には通常のインフルエンザ感染診断およびH5ウイルス感染診断系の構築やウイルス分離技術の実習、バイオセーフティの講習などを行い、疫学担当者にはワクチン、抗インフルエンザ薬の使用、効果、パンデミック対策等の講習が行われた。

- ホーチミン市パスツール (P I) 研究所での H5N1 インフルエンザ感染診断系の再構築。

2004 年の第1波の流行の際に、感染研は P I 研究所に研究員を派遣し、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、再度スタッフを2週づつ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。また、当地の要望により感染研が新たに開発した H5-LAMP の導入についても検討された。

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 ウイルスも並行して分離されたことから、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ことから、それに対する対策を急ぐ必要がある。

本研究では、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 30 分以内に検出できる H5-LAMP 法を開発し、2004 年末から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ものと思われる。

一方、流行発生当事国では、RT-PCR の感度不足や技術的未熟さ、さらには実験室管理のずさんさなど多くの問題を抱えており、ソフト面とハード面両方からの技術支援が必要である。感染研では昨年度から現地での技術支援を開始しているが、今の状況を乗り切るためには大学などの研究機関も参加した広範な国際貢献が必要である。

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 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)

5 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)

6 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 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。埼玉市、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)

F. 知的所有権の取得状況等

なし

平成 16 年度分担研究報告書

インフルエンザパンデミックに関する危機管理体制と国際対応に関する研究

ベトナム国ハノイ市におけるインフルエンザ流行

分担研究者： 鈴木 宏 新潟大学大学院医歯学総合研究科

国際感染医学講座公衆衛生学分野

共同研究者： 斎藤玲子、菖蒲川由郷（同上）

研究要旨 我々はベトナム国ハノイ市の国立衛生疫学研究所の呼吸器ウイルス室との共同研究でハノイ市内の 2001～2003 年のインフルエンザ流行を明らかにした。2001 年は A/H1N1 13 件, A/H3N2 10 件, B 型 56 件, 2002 年 A/H1N1 9 件, A/H3N2 26 件, B 型 5 件, 2003 年 A/H1N1 0 件, A/H3N2 55 件, B 型 1 件のインフルエンザを検出した。年ごとに流行型やサブタイプの違いはあるものの, 6, 7 月の暑い雨期と 12-2 月の寒い冬の二峰性のインフルエンザ流行をみとめ本邦のインフルエンザ流行とは時期が違うことを明らかにした。また A 型インフルエンザについてアマンタジン耐性を検討し, 2001 年 0/8 件(0%), 2002 年 1/35 件(2.9%), 2003 年 1/55 件(1.8%)がアマンタジン耐性であった。

A. 研究目的

2003-2004 年初頭にかけて高病原性インフルエンザ A/H5N1 がアジア各地で猛威をふるい多くの家禽が感染し, さらにベトナム及びタイでは鳥から人への感染をおこし高い致命率(約 80%)を示した。同地域では, その後 2004 年 8～9 月と 2005 年初頭にも家禽の A/H5N1 感染に端を発したヒト感染が報告された。A/H5N1 感染症は現在まで鳥から人への感染, または家族内感染が示唆されるのみで, 厳密な意味での人から人への感染は確認されていない。しかし, この A/H5N1 が突然変異や通常流行型のインフルエンザと遺伝子再集合により有効な人から人への感染をひき起こし, パンデミックインフルエンザとなる可能性は常に存在し, インフルエンザの研究の重要性は増している。しかしながら熱帯、亜熱帯地域では通常流行型(A/H1N1, A/H3N2, B 型)インフルエンザの疫学研究報告が少なく, インフルエンザの流行時期さえも明らかでない地域が多い。ハノイ市はベトナム北部に在し, 亜熱帯型気候

で 6 月～7 月の暑い時期に雨期を迎えるが, 1, 2 月は比較的寒く香港の気候に近い。

我々は 2001 年よりベトナム国ハノイ市の国立衛生疫学研究所(National Institute of Hygiene and Epidemiology, 以下 NIHE)の呼吸器ウイルス室でインフルエンザサーベイランスの立ち上げと実験室診断技術指導・支援を行ってきた。このたび 2001～2003 年までハノイ市のインフルエンザ流行疫学についてはじめて解析し, さらに A 型インフルエンザについてアマンタジン耐性を分析したため報告する。

B. 研究方法

2001～2003 年にハノイ市内の病院数カ所で急性呼吸器症状を呈する患者から咽頭・鼻腔ぬぐい液を採取した。NIHE にて MDCK および Hep-2 細胞にてウイルス分離を行った。インフルエンザ培養陽性検体を中心に選択し, 咽頭・鼻腔ぬぐい液から直接 RNA 抽出を行い, RT-PCR にて A 及び B 型検出とサブタイプ決定を行い, さ

らに PCR で A 型インフルエンザ陽性検体については M2 蛋白部分のシーケンスを行いアマンタジン耐性化有無を確認した。

C. 研究結果および考察

2001 年は 2185 件, 2002 年は 1536 件, 2003 年は 1289 件咽頭ぬぐい液がハノイ市内で採取された。各年それぞれ, 72 件, 188 件, 247 件を選択し PCR を行った。2001 年は A/H1N1 13 件, A/H3N2 10 件, B 型 56 件, 2002 年 A/H1N1 9 件, A/H3N2 26 件, B 型 5 件, 2003 年 A/H1N1 0 件, A/H3N2 55 件, B 型 1 件のインフルエンザを検出した。月別流行曲線では, 2001 年は 5, 6 月をピークとした B 型が主流の流行で, 7 月から A/H3N2 も検出され, 2001 年末には A/H1N1 へと変わった。2002 年は 6, 7 月をピークとした A/H1N1 と A/H3N2 の混合流行がみられ, 2002 年末には B 型へと移行した。2003 年 3 月から 5 月にかけては SARS の流行のため検体採取が中止され, 再開後 6, 7 月に A/H3N2 の流行がありその後もこのサブタイプの流行が続き, さらに 12 月に A/H5N1 ヒト感染が確認された (図 1)。

一般に温及び寒帯では寒い冬に患者の爆発的流行があり, それ以外の時期ではほとんどインフルエンザが検出されないのに対し, ハノイでは通じ暑い雨期と寒い冬の二峰性を示し, 暑い時期のピークが大きく, それ以外の時期でも年中を通じてインフルエンザが検出される亜熱帯型の特徴的な流行パターンをしめした。

A 型インフルエンザに関しアマンタジン耐性の有無を確認したところ, 2001 年 0/8 件 (0%), 2002 年 1/35 件 (2.9%), 2003 年 1/55 件 (1.8%) にアマンタジン耐性 A 型インフルエンザを確認した。本邦ではアマンタジンのインフルエンザ使用認可前はアマンタジン耐性株が市中株に検出されず, 認可後も 1-3%にとどまっていること, ベトナムではアマンタジンをインフルエンザ治療・予防に使っておらず, 薬剤の選択プレッシャーはかかっていないことを考慮すると, ハノイ市中株でのアマンタジン耐性株の存在はその由来

を含めて非常に興味深い。

E. 結語

我々は次のパンデミック株となりうる可能性のある H5N1 のヒト感染が確認されたハノイ市のインフルエンザ流行とアマンタジン耐性化を検討した。H5N1 と通常流行型の遺伝子再集合の可能性を考えると今回の調査は非常に重要な意味をもつ。抗インフルエンザ剤は新型インフルエンザ対策として重要なコントロール手段である。2004 年にアジアで流行した H5N1 はアマンタジン耐性であったためその後の新型インフルエンザ対策ではノイラミニダーゼ阻害剤が優先されている感がある。しかしアマンタジン耐性状況についてはその時の株によって変化し新型ウイルスがアマンタジン感受性である可能性も大きい。ため, 安価で安定な M2 阻害剤も選択されるべきであろう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai, T., H. Suzuki, et al. "Geographic and temporal trends in influenzalike illness, Japan, 1992-1999." *Emerg Infect Dis* 10(10): 1822-6. 2004
2. 鈴木宏, 齋藤玲子 "インフルエンザの予防と治療薬." *現代医療* 36(11): 2256-2261. 2004
3. 鈴木宏 "インフルエンザと国際保健." *インフルエンザ* 6(1): 5-6. 2005
4. 齋藤玲子, 佐々木亜里美, 鈴木宏. "インフルエンザ一合併症." *診断と治療* 92(12): 2239-2242. 2004
5. 齋藤玲子, 佐々木亜里美, 鈴木宏. "地域社会レベルにおけるアマンタジン耐性ウイルスの出現状況." *インフルエンザ* 5(4): 329-334. 2004
6. 齋藤玲子, 佐藤瑞穂, 鈴木宏 "インフルエン

ザの治療：アマンタジン治療と耐性化。”最新医学 59(2)：295-300. 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

2. 学会発表

1. 齋藤玲子、西川眞、佐々木亜里美、菖蒲川由郷、佐藤牧、鈴木宏。ベトナム国ハノイ市におけるインフルエンザ A/H5N1, 及び市中株インフルエンザ A/H1N1, H3N2 におけるアマンタジン耐性株検出頻度。第 52 回日本ウイルス学会学術集会。2004 年 11 月 21-23 日。横浜。
2. 菖蒲川由郷、坂井貴胤、齋藤玲子、佐藤牧、佐々木亜里美、鈴木宏、谷口清洲。GIS (Geographic Information System 地理情報システム) によるインフルエンザの疫学研究。第 52 回日本ウイルス学会学術集会。2004 年 11 月 21-23 日。横浜。
3. R. Saito, HLK. Nguyen, MQ. Le, HK. Nghiem, H. Suzuki, LT. Hoang, LP. Huynh. Amantadine Resistant influenza A in Northern Viet Nam JSPS Workshop on Infectious Diseases. November 25-27, 2004. Nagasaki, Japan
4. H. Suzuki, T. Sakai, R. Saito. Visualizing geographic and temporal trends in influenza virus activity in Niigata. JSPS Workshop on Infectious Diseases. November 25-27, 2004. Nagasaki, Japan
5. R. Saito, H. Suzuki, A. Suzuki, HLK. Nguyen, LT. Hoang, MQ. Le, LP. Huynh. Prevalence of Amantadine Resistance of Influenza A Subtypes H1N1, H3N2 and H5N1 in Humans in Northern Vietnam. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 7-10, 2004. Kyoto, Japan

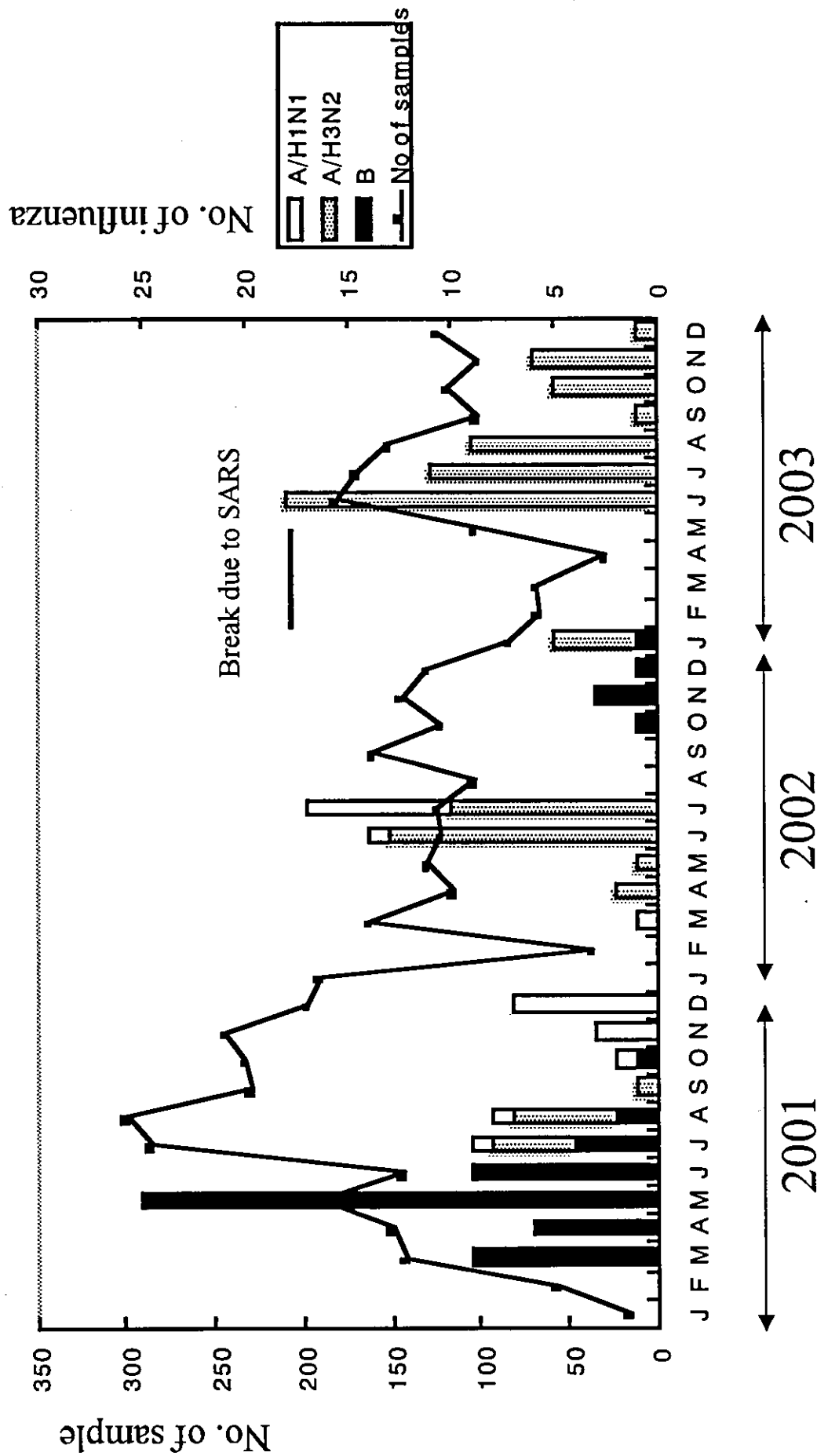


图1. Influenza circulation in Hanoi, Viet Nam from 2001 to 2003. Number of samples and influenza detected in National Institute of Hygiene and Epidemiology

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
インフルエンザウイルスパンデミックに対する危機管理体制と国際対応に関する研究
分担研究報告書

抗ウイルス剤の開発と応用・実用化

分担研究者 鈴木康夫 静岡県立大学薬学部教授

研究要旨 1) トリインフルエンザウイルスおよびヒトインフルエンザウイルスの受容体シアロ糖鎖識別を明らかにした。2) ウイルスを再生することにより、1918年パンデミックスペイン風邪ウイルスは、ヒト-ヒトへの伝播可能なウイルスへ変異していたことを明らかにした。3) ヒトの初代培養気道細胞には高病原性トリインフルエンザウイルスの感染を可能とする、シアロ糖鎖受容体構造が存在することを明らかにした。4) 抗炎症薬（インターール：クロモグリク酸ナトリウム）は抗インフルエンザ作用を持つことを細胞および動物レベルで明らかにした。5) インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体の3つの受容体結合ポケットにはまり込む新規抗インフルエンザ剤を見いだした。また、キトサンポリマーにシアリルラクトースを付加した分子は、効果的にインフルエンザウイルス感染を阻害すること、上記を繊維状に誘導体化した繊維は、インフルエンザウイルスを効果的に吸着することを見いだした。

A. 研究目的

平成 16 年度におけるインフルエンザの流行は世界的に見て極めてインパクトが高い特徴を持っていた。すなわち、1997 年、ホンコンで発生した高病原性トリインフルエンザウイルス（H5N1 亜型）のヒトへの伝播を皮切りに、中国における H9N2 亜型トリインフルエンザウイルスのヒトへの伝播、2003 年 12 月以降における、高病原性トリインフルエンザウイルス（H5N1 亜型）の我が国を含むアジア各国への拡散、タイ、ベトナムにおける本ウイルスのヒトへの伝播、本ウイルスのヒト-ヒト間での感染の可能性の指摘など、新たな機構によるパンデミックの可能性が高まり、本研究の意義・重要性が認識された。

このような背景を基に、本研究では、次の目標を立てた。すなわち、1) 高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトへの伝播機構の解明、2) 1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルス

の再生と受容体認識特異性の解析（トリ型インフルエンザウイルスからヒト型インフルエンザウイルスへの変異機構解析の一環として）、2) 新たな視点による抗インフルエンザ薬剤、インフルエンザウイルス吸着剤の開発である。これら、達成するために、a) リバーズジェネティクスによる、1918 年スペイン風邪インフルエンザウイルスヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ遺伝子を含むウイルスの再生、b) ヒト、トリインフルエンザウイルスの受容体認識の相違の解析、すなわち、ウイルスヘマグルチニンが認識するシアロ糖鎖認識機構の分子生物学的解析、さらに、c) ヒト気道細胞におけるトリインフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するシアロ糖鎖受容体の解析、d) ウイルスの変異を克服する新たな抗インフルエンザ剤の開発基盤の確立、f) 高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトへの伝播機構を解明するためのアジア各国との共同研究体制確立の準備などを行った。

B. 研究方法

1918年スペイン風邪インフルエンザウイルスの再生: リバースジェネティクスの手法により WSN(H1N1)ウイルスにスペイン風邪ウイルス由来のヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ遺伝子を導入。ウイルスを産生させた (P4 実験室使用)。トリ、ヒトインフルエンザウイルスの受容体認識特異性の解析: 我々が開発した Neu5Ac2-3Gal および Neu5Ac2-6Gal 構造を含むシアロ糖鎖ポリマーおよび糖脂質を用いるウイルス結合特異性検出法によった。ヒト気道細胞におけるトリインフルエンザウイルス受容体の検索: ヒト気道粘膜細胞の初代培養細胞を用いて、シアル酸 2-3Gal, シアル酸 2-6Gal を識別するレクチンによる結合性、シアル酸 2-3Gal 特異的シアリダーゼによる受容体機能の変化、シアル酸 2-3Gal を特異的に識別するパラインフルエンザウイルスへの結合特異性などを指標とした。

C. 研究結果

1) 高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) およびヒトインフルエンザウイルスの受容体シアロ糖鎖識別: 我々は、以前から、カモやニワトリから分離されるウイルスは Neu5Ac2-3Gal1-4(3)GlcNAc- 結合を、ヒトから分離されるウイルスは Neu5Ac2-6Gal1-4(3)GlcNAc-I 結合を認識することを明らかにしてきた。そこで、これらの糖鎖をグルタミン酸ポリマー上に発現している人工ムチンを酵素化学手法により合成した。これらの分子は、効率的にトリインフルエンザウイルスおよびヒトインフルエンザウイルスと結合し、フェツインへの本来の結合性が阻害されることを確認し、本物質が、高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) とヒトから分離されるインフルエンザウイルスとを識別する上で非常に有用であることを見いだした。これを用いて、再生した 1918 年パンデミックインフルエンザウイルスの受容体認識特異性を調べた。一方、Neu5Ac

α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Ceramide (2-3 シアリルパラグロボシド) はトリインフルエンザウイルスと、Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Ceramide (2-6 シアリルパラグロボシド) は、ヒトインフルエンザウイルスと特異的に結合することも明らかにし、これらのスフィンゴ糖脂質の分離精製、単離を行なった。

2) 1918年パンデミックスペイン風邪ウイルスの再生と受容体認識特異性の解析: リバースジェネティクスの手法により、H1N1 亜型である NWS 株に 1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルスのヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ遺伝子を導入、ウイルス粒子を産生した (カナダにおける P4 施設を使用)。これを用いて、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1- および Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-を含むグルタミン酸ポリマー (上記1) 参照) への結合特異性を調べた。1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルスは、トリを起源としている。トリから分離されるインフルエンザウイルスの受容体認識は、Neu5Ac2-3Gal に特異性を持つ。今回、1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルス株が、ヒト-ヒト間の伝播を可能とする受容体認識特性 (Neu5Ac2-6Gal) への変異がおこり、トリ型からヒト型への受容体糖鎖認識の変異があるか否かを調べた。その結果、1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルスのヘマグルチニンは、ヒト-ヒト間の伝播を可能とする受容体シアロ糖鎖認識特異性 (Neu5Ac2-6Gal) を持つことを見いだした (Nature, 2004 掲載)。この結果は、野生水トリに貯留されていたインフルエンザウイルスが何らかの機構により、種の壁を越える変異、病原性獲得の変異を起こすことによりヒト-ヒト間伝播可能となり 1918 年パンデミックスペイン風邪ウイルスが新興した可能性が示された。現在アジア各国で発生している高病原性トリインフルエンザウイルスはタイ、ベトナムにおいてすでにヒトへの伝播を果たしている。このウイルスのヒト型への変異を常にサーベイする必

要がある。本研究で得られた方法はこれを行う上で極めて有効であると考えられる。

3) ヒト気道初代培養細胞におけるトリインフルエンザウイルス受容体の存在：高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)は、1997年、記録史上初めて、ホンコンでニワトリからヒトへ直接伝播した。その後、中国福建省へ帰省したホンコン在住の家族、2003年12月以降、韓国、日本を経て、アジア各国へ拡散したニワトリインフルエンザウイルスのタイ、ベトナムでのヒトへの伝播など、さらに、2005年1月には、タイでの高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)のヒト-ヒト間伝播の可能性を示す報告など、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)のヒトへの伝播がいくつか報告されている。また、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)に感染したニワトリを餌として与えられたトラへの伝播(タイ)も報告された。これらの事例では、感染ニワトリとの直接接触、捕食などが原因とされた。本研究では、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)のトリ-ヒトへの感染機構を明らかにするために、ヒト気道細胞上にトリインフルエンザウイルスの受容体である Neu5Ac α 2-3Gal β 1-シアロ糖鎖が存在するか否かを検証した。Neu5Ac α 2-3Gal β 1-および Neu5Ac α 2-6Gal β 1-を認識できるレクチンとの反応性、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-を認識するヒトパラインフルエンザウイルスの気道細胞への吸着性、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-結合のシアリ酸を特異的に切断するシアリダーゼ処理などにより、ヒト初代気道上皮細胞には、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-結合が存在する可能性を明らかにした。これまで、ヒト気道細胞には、Neu5Ac α 2-6Gal β 1-が存在することは知られていたが、今回これに加えてトリインフルエンザウイルスの受容体であるシアロ糖鎖、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-の存在も明らかとなった(Glycoconjugate J. 2005、印刷中)。

4) 新たな視点による抗インフルエンザ剤、イ

ンフルエンザウイルス吸着剤の開発：クロモグリク酸ナトリウム(インタール)は、粟草から分離された、抗炎症性薬であり、長年臨床に使用され、安全性は確認されている医薬品である。今回、このクロモグリク酸ナトリウムに抗インフルエンザウイルス活性を認め、細胞および動物実験でその効果を確認した(Biol. Pharm. Bull., 2004)。このように、すでに臨床的に使用され、安全性が確認されている医薬品について抗インフルエンザ活性を調べることも意義がある。さらに、ウイルスヘマグルチニン3量体のポケットへはまりこむテイラーメイドの抗インフルエンザウイルス剤を創製した。環状ペプチドに、シアリルラクトース(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -)側鎖3本を付加発現した人工分子は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体に存在する3つのレセプター結合ポケットに充填し、ウイルス感染を阻害した(Angew. Chem., Intn., 2004)。天然キチンから誘導されるキトサン(グルコサミンのポリマー)にシアリルラクトース(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -)側鎖を付加した物質は、効率的にインフルエンザウイルスを吸着できる性質を持つこと、これをさらに繊維状になるように誘導したポリマー繊維もインフルエンザウイルスを吸着することを見いだした。本物質は、インフルエンザウイルスの吸着剤として、様々な応用が期待される。

D. 考察

今回、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(3)GlcNAc β 1-構造は、トリインフルエンザウイルスと、Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4(3)GlcNAc β 1-構造はヒトインフルエンザウイルスと結合し、両者はトリおよびヒトインフルエンザウイルスの受容体認識特異性を決定する上で有用なプローブとなることを見いだした。今後、これらの糖鎖の大量合成法を確立し、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1亜型)のヒト-ヒト間伝播可能なウイルスへの変異をサーベイする試薬合成を遂行することが重要である。さらに、1918年パンデミック

スペイン風邪ウイルスの再生、その受容体認識特異性の結果から、現在アジアに広がっている高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 亜型)のヒトへの侵入、パンデミック発生の可能性を想定出来ることが解った。今後、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 亜型)のヒトへの侵入、パンデミック発生に関し、これまで行われなかった受容体サーベイランスを行うことが非常に重要であることが明らかとなった。

今回、ヒトの初代気道上皮細胞には、トリインフルエンザウイルスに対する受容体シアロ糖鎖、Neu5Ac α 2-3Gal β 1- が存在することを明らかにすることができた。これまでにタイ、ベトナム、ホンコンでは高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 亜型)がヒトへ伝播した。原因は、これまで、明らかでなかったが、本結果により、高濃度の高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 亜型)が直接ヒトの気道に侵入した場合、トリインフルエンザウイルスに対する受容体 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-) を介してブタなどを介さず、ヒトへ直接感染する可能性が示された。今後の対策に有益な情報が得られた。

インフルエンザパンデミックが発生した場合、効果的なワクチンの作成には数ヶ月が必要とされる。21世紀型のパンデミックは大量交通手段により、極めて短時間にウイルスが世界中に拡散される。そこで、ワクチンを補い、治療にも効果を発揮し、抗原変異を克服した抗インフルエンザ薬の開発が強く望まれる。

E. 結論

1) 高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) のヒトへの伝播、ヒト-ヒト間感染可能な変異ウイルスの発生を未然に予知するインフルエンザウイルス受容体サーベイランス法の開発が、パンデミック発生を予測する上で極めて重要である。今回は、トリおよびヒトインフルエンザウイルスが識別するシアロ糖鎖構造を明らかにした。

2) 1918年パンデミックスペイン風邪ウイ

ルスはトリ由来であるが、ヒト-ヒトへの伝播可能なウイルスへ変異していたことを、1918年パンデミックスペイン風邪ウイルスへマグルチニンおよびノイラミニダーゼを導入したウイルス再生により明らかにした。

3) ヒトの初代培養気道細胞には高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) やトリインフルエンザウイルスの感染を可能とする、シアロ糖鎖受容体 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-) 構造が存在することを明らかにした。これにより、高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) は、ヒトへ直接且つ大量暴露された場合、ブタなどを介さず、直接ヒトへ感染可能であることが分子レベルで明らかとなった。

4) すでに臨床で安全性が確認されている抗炎症薬 (インターン: クロモグリク酸ナトリウム) は抗インフルエンザ作用を持つことを細胞および動物レベルで明らかにした。

5) インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体の3つの受容体結合ポケットに填入む新規抗インフルエンザ剤を見いだした。また、キトサンポリマーにシアリルラクトースを付加した分子は、効果的にインフルエンザウイルス感染を阻害すること、上記を繊維状に誘導体化した繊維は、インフルエンザウイルスを効果的に吸着することを見いだした。

4)、5)の結果は、インフルエンザパンデミックが発生した場合、ワクチンを補填し、治療、予防に効果的な抗インフルエンザ薬の開発が可能であることを示しており、今後の応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Suzuki: Sialobiology of influenza -Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses- (Review)
Biological Pharmaceutical Bulletin 28 (3) 399-408 (2005)

K. Mori, Chie Sugimoto, S. Ohgimoto, T. Shioda, S. Kusagawa, Y. Takebe, M. Kano, T. Matano, T. Yuasa, D. Kitaguchi, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M.

Yamanisi, A. Kimura, N. Yamamoto, Y. Suzuki, Y. Nagai: Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol*. Submitted (2005)

K. I.P.J. Hidari, N. Horie, T. Murata, D. Miyamoto, T. Suzuki, T. Usui, and Y. Suzuki: Purification and characterization of a soluble recombinant human ST6Gal I functionally expressed in *Escherichia coli*. *Glycoconjugate J.*, 22, 1-11 (2005)

Darwin Kobasa, A. Takada, K. Shinya, Peter Halfman, M. Hatta, Steven Theriault, H. Suzuki, H.Nishimura, K. Mitamura, N. Sugaya, T. Usui, T. Murata, T. Suzuki, Y. Suzuki, Heinz Feldman, Y. Kawaoka: Enhanced pathogenicity of influenza A viruses possessing the haemagglutinin of the 1918 pandemic. *Nature*, 431, 703-707 (2004)

K. I.P.J. Hidari, E. Tsujii, J. Hiroi, E. Mano, A. Miyatake, D. Miyamoto, T. Suzuki and Y. Suzuki: *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Effects of Disodium Cromoglycate on Influenza Virus Infection. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 27(6) 825-830 (2004)

T. Suzuki, T. Takahashi, T. Saito, Chao-Tan Guo, K. I.-P. Jwa Hidari, D. Miyamoto, Y. Suzuki: Evolutional analysis of influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity. *FEBS LETT.* 557, 228-232 (2004)

K. Sasaki, Y. Nishida, M. Kambara, H. Uzawa, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi: Design of *N*-acetyl-6-sulfo-D-glucosaminide-based inhibitors of influenza virus sialidase. *Bioorg. & Medicinal Chem.*, 12, 1367-1375 (2004).

2. 学会発表

Y. Suzuki: Glycobiology of influenza virus hemagglutinin. Interlec 21 - 21th International Lectin Meeting (Shonan Village, Kanagawa, Japan), Abstract book pp. S11, 2004, May 23-28

Y. Suzuki, Kazuya I.-P.J. Hidari, D. Miyamoto, T. Suzuki, C-T. Guo, T. Ito, H. Kida, Y. Kawaoka, O. Kanie, K. Kobayashi: Mechanism of host range variation of influenza viruses and the development of new anti influenza agents 5th Japan-China International Congress of Virology (Osaka, Japan), Abstract book pp.35, 2004, June 10-11

Y. Suzuki, T. Suzuki, K. I.-P.J. Hidari, D. Miyamoto, Chao-T. Guo, T. Takahashi, M. Shimizu, T. Ito, H. Kida, Y.o Kawaoka, O. Kanie, K. Kobayashi: Sialobiology of Influenza viruses. Sialobiology 2004, 4th International Conference (St. Andrews, Scotland), Abstract book pp.41, 2004, July 27-30

Y. Suzuki: Receptors for bird and human influenza viruses First China-Japan Bilateral Symposium on Avian Influenza (Beijin, China), Abstract book pp. 18-19, 2004, Oct. 18-19

鈴木康夫：トリインフルエンザの蔓延とヒトインフルエンザの流行について フォーラム 2004：衛生薬学・環境トキシコロジー、pp. 39 幕張メッセ（千葉）、2004年10月25日

T. Takahashi, T. Suzuki, T. Saito, Chao-Tan Guo, K. I.-P.J. Hidari, D.Miyamoto, Y. Suzuki: Molecular mechanism and evolutional analysis of human influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity. Joint Meeting of the Soc. for Glycobiology and the Japanese Soc. of Carbohydrate Research (Hilton Hawaiian Village, Honolulu HI, USA) Abstract book, pp. 1153-1154, 2004, Nov. 17-20

M. Okumura, Kazuya I.-P.J. Hidari, Reiko Mizuno, Shotaro Iwamoto, Kazuo Kon, Susumu Ando, Yoshiaki Yamaguchi, Koichi, Kato, Tadanobu Takahashi, Chao-Tan Guo, Daisei Miyamoto, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki: Identification of sialo-sugar receptors for influenza viruses. Joint Meeting of the Soc. for Glycobiology and the Japanese Soc. of Carbohydrate Research (Hilton Hawaiian Village, Honolulu HI, USA) Abstract book, pp. 1176, 2004, Nov. 17-20

Y. Suzuki: Functional glycomics of viral infection and its application for the development of antiviral agents.