

200401230A

厚生労働科学研究研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保
に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小田切孝人

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

平成 16 年度

I. 総括研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

主任研究者：小田切孝人 _____ P2

II. 分担研究報告書

1. 遺伝子操作技術(リバーシ・ジェネティクス)によるインフルエンザワクチン株開発に関する基本指針の研究

田代真人 _____ P10

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

河岡義裕 _____ P17

3. 新型インフルエンザワクチンの製造に用いる細胞株の検索

今井正樹 _____ P21

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

二宮 愛 _____ P25

5. アジュバント併用経鼻 H5 インフルエンザワクチンの有効性の解析

長谷川秀樹 _____ P32

協力研究者：尾崎泰子、一戸猛志、佐多徹太郎、板村繁之

6. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

神谷齊 _____ P38

協力研究者：中野貴司、大熊和行

7. リバーシジェネティクス法による新型インフルエンザワクチン株の作出に使用する細胞バンクの構築

水野喬介 _____ P60

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P64

IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添)

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 室長 小田切孝人

研究要旨

新型インフルエンザウイルスによる汎流行が起こると、全世界を巻き込んだ甚大な健康被害と社会的損失・混乱が発生する。被害を最小限にとどめるためには、事前の対策と準備が重要である。そのために、本研究では新型インフルエンザ対策の根幹となる安全かつ有効なワクチンの開発および安全供給体制の確立をめざしている。既に前年度から強毒型H5N1野生株を弱毒化するリバースジェネティクス(RG)システムが稼働していることから、本年度は2004年の国内外のH5N1流行株から弱毒化試作ワクチン株を作製し、ワクチン製造株の迅速供給体制を構築した。一方、RG法により作製されるワクチンのバイオセーフティーの問題、生物学的製剤としての品質管理等に関する国際的なガイドラインが必要になったことから、本研究ではWHO世界インフルエンザ計画と協力してこれを作成した。試作ワクチンの免疫原性や感染防御効果を高めるために、アルムアジュバント添加の皮下接種用ワクチン、さらに局所分泌型免疫誘導を可能にする不活化経鼻接種用アジュバントワクチンの開発を行い、それぞれの効果についてマウスモデルで検討した。皮下接種法においてはアジュバント添加でワクチン抗原量を1/10にできることが分かり、これによってワクチンドースを節約できることを示唆した。また、経鼻接種用アジュバントとしては、polyI:Cとキチン微粒子の混合物が有用であることが示され、引き続き最近のH5N1分離株での有効性が検討される。一方、RG法を採用したヒト用ワクチン株製造には、GMP管理下でセルバンクから由来した細胞株が必要である。本研究ではLLC-MK2細胞でセルバンクを構築し、その安全性試験を開始した。さらに、小児における現行のHAワクチンの接種量と副作用の出現に関する検討を行い、新型ワクチン使用時の参考情報を提供した。

研究組織

研究組織		主任研究員	
主任研究者	小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第3部室長	二宮愛	国立感染症研究所ウイルス第3部研究員
分担研究者	田代真人 国立感染症研究所ウイルス第3部部長	長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部室長
	河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授	神谷齊	独立行政法人国立病院機構三重病院 院長
	今井正樹 国立感染症研究所ウイルス第3部	水野喬介 (財)化学及血清療法研究所	部長

A. 研究目的

A型インフルエンザでは数10年周期で新型ウイルスがヒトの世界に出現して地球レベルでの大流行（パンデミック）を起し、大きな健康被害と社会的損失をもたらすことが知られている。2003年末から2004年にかけて東アジア諸国で高病原性H5N1鳥インフルエンザが大流行し、家禽およびヒトへの感染が起こった。わが国でも山口、大分、京都の家禽で流行が発生し総数約27万羽のニワトリが感染および殺処分により失われた。さらに、ニワトリの殺処分に携わった職員の抗体調査により、不顕性ではあったが数名にウイルス感染があった形跡が認められ、改めて予防対策の再検討が図られたところである。わが国では本ウイルスによる流行は4月に終息し、それ以降の再流行は起こっていない。

しかし、東南アジア諸国ではこの流行は鎮静化と再流行を繰り返し、現在は第3波の流行の中にあり当分終息するめどが立っていない。その間、ベトナム、タイ、カンボジアでは総数100例の感染者と54名の死亡者を出すまでに至り、もはやコントロールすることは不可能な状態にある。

現在流行しているH5N1ウイルスは、まだ鳥型でヒトの流行株との遺伝子再集合は起こっていないことから、今のところヒトへの爆発的な伝播力を持っていない。しかし、少数ではあるがヒトからヒトへの感染例も報告されており、今後も増えていくことが予想される。さらに、インドネシアでは新型インフルエンザ発生の中間宿主と見なされてきたブタからも高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスが分離されている。このことは、ヒトの世界へ当該ウイルスが進入する経路が複数あることを意味

しており、本ウイルスに起因したパンデミックが起こる可能性が益々高まってきていることを暗示しているかもしれない。

WHO世界インフルエンザネットワークでは、これまで数度にわたりパンデミック対策の実施を各国に呼びかけてきたが、わが国における対応はまだ不十分な状態にある。本研究班では、新型インフルエンザ対策の一翼を担うワクチン開発と安全供給に関する研究を担当するために昨年度からスタートし、RG法を導入した弱毒型ワクチン株の製造システムの構築に成功した。これによって、短期間で弱毒型ワクチン株の供給ができる目処がついたことから、ワクチン開発のスピードは流行株をいかに速く入手できるかにかかってきた。しかし、米国で起こった同時多発テロ事件や炭疽菌によるテロ事件以来、海外からのH5およびH7亜型鳥インフルエンザウイルスの輸入や国内からの輸出に対しては新たに厳しい規制が設けられ、ワクチンの元株となる野生株を国際間で迅速に交換することは困難になってきている。RG法という革新的な技術でワクチン製造株を速やかに準備できる体制ができて、行政対応の遅滞がブレーキをかける事態は避けなければならない。これに関しては関連省庁間での連携と協力による迅速対応を求めている。

一方、ワクチン製造にRG法を採用した場合は、米国企業が所有するプラスミドベクターにかかる知的所有権問題が障壁のひとつとなっている。米国やEUではこの問題は既に解決していると言われているが、わが国のワクチンメーカーにとってはまだ解決の目処すら立っていない。パンデミックの危機管理体制が強く求められている現状を認識した緊張感のある

速やかな対応に期待したい。

RG法において強毒型ウイルスから弱毒化ワクチン株を作製するためには、プラスミドDNAを導入し遺伝子組み換えウイルスを回収するための細胞株が必須である。ヒト用のワクチン製造株を作製するためには、GMPで管理された施設において作製されたセルバンク由来の承認された細胞株を使用しなければならない。しかし、わが国にはBSL3実験室を備えたGMP施設はなく、また、ヒト用インフルエンザワクチン株製造に採用できる細胞株も存在しない。従って、現時点では新型ワクチン製造株は海外からの分与に頼らざるをえない。そこで、わが国でも感染研にBSL3実験室を備えたGMP施設を平成19年までに作ることになり、施設面での問題は解決される見通しがついた。一方、細胞株についてはWHOが推奨するVero細胞株は欧米のワクチンメーカーが所有しているものしかなく、それらは入手できる可能性はまったくないことから、本研究班で独自に開発することとなった。本年度はこの目標を達成するために、RG法に最適な細胞株を検索し、そのセルバンクの構築と細胞株の安全性試験項目の設定および安全性試験を実施した。

一方、鳥インフルエンザウイルスを用いたワクチンの有効性については、1997年のH5N1感染事例の際に試作したH5N1スプリットおよび全粒子ワクチンの臨床試験により、鳥インフルエンザのHA、NA蛋白を含むインフルエンザワクチンはヒトには免疫原性が極めて低いことを我々は経験した。海外でも同様の観察結果が報告されていることから、アルムアジュバントを添加したワクチンの開発が検討課題となっている。本研究班ではヒトでの臨床試験に先駆けてマウスを用いた動物実験で、アジュバント添加によるワクチン効果とワクチン抗原量につ

いて検討し、アジュバントワクチン開発への基礎情報を提供する。

B. 研究方法

1. RG法を用いて作製されるワクチン製造株に関する技術的な問題点、遺伝子組換え操作・遺伝子組換え医薬品としての位置づけ、安全性の評価、バイオセフティー管理上の評価と対応、生物学的製剤の原材料製造過程としての位置づけとGMPとの関係等に関して、現在の施設、設備、対応能力を把握し、現実的に緊急に対応する必要性を勘案して、現時点における基本指針を検討した。

2. RG法により、A/Vietnam/JP1203/04 (VNJP1203, H5N1) 株、A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) 株由来の弱毒化ワクチン株を試作した。さらに、試作ワクチン株の病原性を発育鶏卵での増殖性により評価した。

3. ウイルスの抗原解析：

A/duck/Hong Kong/820/80 ウイルスに対するヤギ高度免疫血清、A/Hong Kong/213/03 ウイルスに対するウサギ高度免疫血清、A/Vietnam/1194/04 に対するフェレット感染血清、A/Vietnam/1203/04 に対するフェレット感染血清、抗A/duck/Hong Kong/739.2/02 ウイルスに対するアヒル感染血清、A/goose/Hong Kong/437/99 ウイルスに対するニワトリ感染血清を用いた赤血球凝集阻止試験を行った。

4. rg-A/HK/213/2003 (dH5N1) × A/PR/8/34 (Internal) (rgHK213/03) 株由来のアルムアジュバント試作ワクチンをマウスに皮下接種し、免疫原性、感染防御効果について検討した。

5. RG法で弱毒化した A/HK/156/97 (H5N1) 株由来の試作ワクチン (HK9-1-1, H5N1) に経鼻接種用アジ

ユバントとしてコレラトキシン B サブユニット (CTB; Sigma-Aldrich)、合成二本鎖 RNA (polyI:C)、キチン微粒子 (chitin micro-particles : CMP, Sigma-Aldrich) を種々の組み合わせで混合し、マウスに経鼻接種し、抗体応答、感染防御効果、病理学的所見について解析した。

6. A/ニューカドニア/20/99(H1N1) (以下「A/ニューカドニア」), A/パナマ/2007/99(H3N2) (以下「A/パナマ」), B/山東/7/97 (以下「B/山東」) の3種混合ワクチン (抗原含有量: 各株 HA 蛋白 $30 \mu\text{g/mL}$) を0~5歳児に対しては0.25mL, 6~12歳児に対しては0.5mLを4週間間隔で2回皮下接種した。ワクチン接種前, 1回接種4週間後, 2回接種4週間後の3回採血を行い, 赤血球凝集抑制 (HI) 抗体を測定した。さらに、ワクチンの副反応は、接種後48時間以内の全身副反応 (37.5°C 以上の発熱, 発疹) と局所副反応 (発赤, 腫脹, 硬結) について保護者からの返信用はがきにより調査した。

7. GMPに準拠した細胞株の検討:

既存のワクチン製造用 Vero 細胞から限界希釈法によって血清含有培地及び無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンを作成した。さらに、ATCC より4種類のサル由来細胞株 (アフリカミドリザル腎臓由来の CV-1 細胞 (CCL-70)、アフリカミドリザル腎臓由来の BS-C-1 細胞 (CCL-26)、アカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞 (CCL-7, CCL-7.1)) を購入し、RG 法に最適な細胞株の検討を行った。

8. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンク作製と安全性試験:

上記細胞株から RG 法に適した株として LLC-MK2 Derivative 細胞が特定された。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞について ICH ガイドライン (Q5A, Q5D) を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等

の安全性情報に関する試験を実施した。

C. 結果と考察

1 遺伝子操作技術 (RG 法) によるインフルエンザワクチン株開発の基本指針。

新型インフルエンザワクチン製造株を安全にしかも短期間で作製するためには RG 法が最適である。昨年度本研究班も参加して作成された WHO のガイドラインでは、RG 法で作製されたワクチン株の取り扱い、安全性試験等についての指針が示された。しかし、遺伝子組み換え操作やバイオセーフティーの問題、生物学的製剤としての品質管理の問題などについては世界的な管理規定や指針がない。このため、一定の国際基準を作成する必要があり、本研究では WHO 世界インフルエンザ計画と協力して以下の基本指針案をまとめた。

- * RG 法に用いる出発材料となるウイルスの品質に関する指針。
- * RG 法で人用ワクチン製造に用いる細胞株の品質管理に関する指針。加えて、ワクチン株製造に不適である細胞株 (293T 細胞、293T/MDCK 混合細胞など) の明示。
- * ワクチン株製造に用いる試薬に関する指針。
- * RG 操作でワクチン製造株を作製する施設および SOP の作成、バイオセーフティーに関する指針。

これらの指針は現在稼動している海外での現状を基盤として作成されていることから、実際の運用にあたっては、この指針をわが国の施設の現状に合うガイドラインに一部修正した最終版を作成する必要がある。

2 わが国の家禽で流行した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスを用いた試作ワ

クチンの作製。

前年度に A/PR/8/34 ウイルスの cDNA を骨格とした RG 法が構築できたことから、当該年度では 2004 年にわが国の家禽で流行した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス (A/山口/7/2004) を用いた弱毒化 H5N1 試作ワクチンを作製した。同様にベトナムの感染者から分離した株 (A/Vietnam/JP1203/2004) についても、この系を用いた弱毒化試作ワクチンを作製した。これら試作ワクチン株は、孵化鶏卵での増殖性、ニワトリに対する病原性試験などで、弱毒化と高増殖性が確認された。これによって、今後、抗原性の変化した高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された場合でも RG 法により速やかに弱毒化ワクチン候補株を供給できるようになった。

3 皮下接種法によるアルムアジュバント H5N1 ワクチン効果の検討。

1997 年の H5N1 の流行の際に、我々は弱毒化ウイルスを作製し、現行のワクチンと同様のスプリットワクチン、全粒子ワクチンをそれぞれ試作して、ヒトに対するワクチン効果について検討した。その結果、鳥インフルエンザウイルスの表面抗原を持つワクチンはヒトに対して免疫原性が殆どないことが判明した。そこで、ヒトでの使用が認可されているアルムアジュバントを添加したワクチンの開発が試みられ、前臨床試験が開始されている。本研究班では、ヒトでの臨床試験に先駆けて前年度からマウスモデルを用いてアジュバントワクチンの免疫原性や感染防効果を検討してきた。2003 年の H5N1 ヒト分離株を RG 法で弱毒化したワクチンにおいては、アジュバント添

加でワクチン抗原量を 1/10 に減少させることができた。さらに、ホモの強毒型野生株の攻撃感染に対しても抗原量が 1/10 でも感染防御効果があることを確認できた。

このことは、鳥インフルエンザに由来する新型インフルエンザの大流行の際には、アルムアジュバントワクチンを採用することで有効なワクチン供給ができること、さらに、抗原量を減量できることから、現行の国内ワクチン製造能力 (2000 万人分) で全国民が接種できるワクチン量を供給できる可能性が出てきた。

一方、本研究からは、2003 年の H5N1 分離株 (A/Hong Kong/213/2003) で作製したアジュバントワクチンは 2004 年の抗原変異したヒト分離株 (A/Vietnam/JP1203/2004) に対しても、交叉防御効果を持つことが示された。ワクチン株は毎年の流行株と抗原性の一致した最新の分離株で開発することが望ましいが、もし、2004 年の H5N1 ヒト分離株から有効なワクチンが開発できなかった場合でも、2003 年分離株から作製したワクチンでバックアップ可能であることが示唆された。

4 経鼻接種アジュバントワクチンの開発。

新型インフルエンザワクチンとしては皮下接種法によるアジュバントワクチンの開発が先行している。しかし、新型インフルエンザに対応する次世代のワクチン開発も並行して進めておく必要がある。本研究班においては、より自然感染に近い局所免疫を誘導できる経鼻接種ワクチンとそれに用いるアジュバントについて検討した。その結果、不活化ワクチンのみの経鼻接種では免疫効果は得られないが、コレラトキシン B サブユニット (CTB) を添加することで

免疫原性が格段に上がることが確認された。しかし、人用のワクチンを念頭においた場合、このアジュバントは使用できない。そこで、これに変わるアジュバントとして polyI:C およびキチン微粒子の混合物をアジュバントとして採用したところ、CTB に変わり得る程のアジュバント効果が得られることが分かった。この新しい経鼻接種用アジュバントが最近の H5N1 ヒト分離株を用いたワクチンにおいても同様の効果を発揮するのか今後の研究成果が期待される。

5 ワクチン製造株作製のための GMP 基準に準拠した細胞株の開発。

RG法を採用したワクチン株製造ガイドラインが策定され、今後はGMP管理のもとでワクチン株開発をしなければならない。しかし、現行ではRG法に採用できるGMP管理下で作製された細胞株は国内には存在しない。そこで、本研究班では、新たにプラスミド DNA の取り込み効率の高い細胞株を検索し、GMP基準を満たした細胞株の確立を試みた。現在、WHOでは海外メーカーが使用している Vero 細胞をワクチン製造用に推奨しているが、本研究では LLC-MK2(ATCC CCL-7.1)細胞が Vero 細胞よりプラスミド DNA の取り込み効率が良いことを突き止めた。そこで、GMP管理された施設において LLC-MK2 細胞からマスターセルバンクを作製し、さらにその一部からワーキングセルバンクを構築した。これらセルバンクの安全性試験項目を ICH ガイドラインを参考に設定し、各種試験を開始した。これら試験が完了するのは 2005 年の 10 月頃が見込まれている。

ヒト用ワクチン製造に採用できる細胞株は各国の authority によって承認されるこ

とになっていることから、全項目の試験終了後は、国の承認審査を経ることになる。これによって承認後は、わが国にもヒト用のインフルエンザワクチン製造用の細胞株が始めて誕生する。これによって、わが国が抱えている RG法による新型ワクチン株作製上の障害のひとつがやっ取り除かれることになり、この成果が大いに期待される。

6 小児におけるインフルエンザ HA ワクチンの接種量と免疫応答および副作用に関する検討。

わが国では 13 歳未満の小児における現行の HA ワクチンの接種回数は 2 回であるが、年齢群別に接種量は異なっている。そこで、現行の接種量で十分なワクチン効果を誘導できるのか科学的根拠に基づいて検証する必要がある。さらに、ワクチン接種回数と局所副反応との相関についても明らかにしておく必要がある。本研究では、これらについて検証し、以下の結論を得た。

- * ワクチン接種前抗体価 20 倍以下については 0~1 歳児の抗体応答は悪く、感染防御が期待される 4 倍以上の抗体応答を得るためには 2 回接種が必要である。
- * 2~12 歳児では一回接種で 4 倍以上の抗体上昇が見られ、2 回接種しても追加免疫効果は見られない。
- * 2~12 歳児では、ワクチン接種量の違いによる抗体応答の優位差は見られない。
- * 副反応については、1 回接種後に副反応が見られないものは、追加接種しても副反応は出ない。しかし、1 回接種後に副反応が出るものは、2 回接種後にはさらに顕著になり、注意深い経過観察が必要である。

以上の成績は、抗体非保有者はワクチンの1回接種によりプライムされ、2回目の接種でブースターがかかる、一方、抗体保有者は1回接種でブースターがかかるというこれまでの報告を支持している。これらの情報は、新型ワクチンの接種量を検討する上で、重要な参考資料として活用されることとなる。

D 結論

RG法で作製されるワクチン株の取り扱い、安全性試験、遺伝子組み換え操作やバイオセーフティーの問題、生物学的製剤としての品質管理に関する国際的な指針がまとめられた。RG法により国内外で流行した最近の高病原性H5N1鳥インフルエンザ分離株から弱毒化ワクチンの試作に成功した。また、マウス動物モデルによる試作ワクチンの有効性を検討したところ、アジュバント添加により抗原量の節約が可能であること、さらに経鼻接種用の適当なアジュバント候補も特定された。一方、RG法でヒト用のワクチン製造株を作製するための細胞株 LLC-MK2 が特定され、GMP管理下でセルバンクを作製し、ワクチン製造用の承認を得るための安全性試験が開始された。

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 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

なし

遺伝子操作技術（リバーズ・ジェネティクス）による
インフルエンザワクチン株開発に関する基本指針の研究

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第3部長

研究要旨 現行の不活化インフルエンザワクチン製造株の開発は、発育鶏卵で分離された野生株から、発育鶏卵を用いた継代または高増殖性標準株(A/PR/8)との遺伝子分節再集合体の作製によって行われている。しかし、このような試行的な方法によっては、抗原的にワクチン株として望ましい野生株から、ワクチン製造用に適したウイルス株が常に短期間に開発出来るとは限らない。一方、高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン製造株の開発においては、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造に用いることは、従業員に対する安全確保および製造効率の面からは採用できず、ウイルスの弱毒化が必要である。最近、このような諸問題を解決し、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバーズ・ジェネティクス）が開発されてきた。最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。そこで、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

A. 研究目的

現行の不活化インフルエンザワクチン製造株の開発は、発育鶏卵で分離された野生株から、発育鶏卵を用いた継代または高増殖性標準株 (APR/8) との遺伝子分節再集合体の作製によって行われている。しかし、このような試行的な方法によっては、抗原的にワクチン株として望ましい野生株から、ワクチン製造用に適したウイルス株が常に短期間に開発出来るとは限らない。現に、2003/4 年北半球シーズン向けのワクチンにおいては、流行株として予想された A/福建型ウイルスからのワクチン製造に適したウイルス株の開発が、WHO ワクチン株推奨選定会議までには間に合わなかった。やむなく第 2 選択の A/パナマ株が推奨されたが、実際の流行では福建型ウイルスが主流を占め、ワクチンが十分に有効ではなかったとの批判が起こった。

一方、高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン製造株の開発においては、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造に用いることは、万一従業員が感染を受けた際の危険性があり、また発育鶏卵が早期に死んでしまうためにウイ

ルス増殖量が少なく、製造効率が極端に悪いことから、適当ではない。従って、ワクチン製造には、弱毒型もしくは弱毒化したウイルス株を使用する必要がある。最近、このような諸問題を解決し、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバーズ・ジェネティクス）が開発されてきた。これを用いれば、任意の感染性ウイルスを作製することが可能である。

最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対しては、WHO はワクチン製造株の緊急開発を指示した。その実施に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化することが最短かつ確実な選択肢である。しかし、この新技術の応用においては、世界的にも管理規定や指針はない。そこで、我々は、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指

針（案）をまとめた。

B. 研究方法

これまで経験、蓄積されてきたリバーシ・ジェネティクスに関する技術的な問題点、遺伝子組換え操作・遺伝子組換え医薬品としての位置づけ、安全性の評価、バイオセフティー管理上の評価と対応、生物学的製剤の原材料製造過程としての位置づけと GMP との関係等に関する情報、及び国内外における議論を幅広く検討した。これらの情報から得られた合意事項をまとめるとともに、現在の施設、設備、対応能力を把握し、現実的に緊急に対応する必要性を勘案して、現時点における基本指針を検討した。素案をまとめた段階で、WHO を通してパブリックコメントを求め、これらを考慮した最終案をまとめた。

C. 研究成果

最終案の骨子は以下の通りである。

1. 人に使用するインフルエンザワクチンの製造株の開発においては、リバーシジェネティクスの応用が有力な手法として必要とされる。しかし、そのためには、最小限度の実施条件、管理規定が要求される。

[野生株ウイルス]

2. 従来のワクチン製造では、分離ウイルス由来のウイルスを原料としていたために、外来性微生物等の迷入の否定された発育鶏卵由来のウイルスが要求された。しかし、クローン化された遺伝子 DNA を出発材料とするリバーシ・ジェネティクスにおいては、分離ウイルスの由来、細胞および発育鶏卵等の無菌性等は特に問題とならない。但し、適切な製造環境と操作条件が要求され、また作製された候補株については、WHO インフルエンザ協力センターにおいて、抗原性の検証がなされなければならない。

[細胞株]

3. 使用する細胞は、国家品質管理当局により微生物迷入が否定されたものを使用せねばならない。人用ワクチン製造用に承認された細胞が最も適当である。

細胞は、細胞バンク由来で、ワクチン製造用に認可された継代数以内で、なるべく継代数を経ないように管理すべきである。

4. トランスフォーム細胞における腫瘍原性 DNA は、希釈されるので危険性は少ない。承認された細胞を用いていない研究室で作製された遺伝子再集合体はワクチン製造株としては推奨出来ない。当初からリバーシ・ジェネティクスに使用されている 239T 細胞または 239T/MDCK 細胞は人ワクチン用に検証されており、ワクチン株開発用には使用すべきではない。現時点では、承認された Vero 細胞が使用できる。他の細胞の開発も必要である。

[試薬類]

5. すべての操作に使用する試薬類は高品質のものを用いる。動物由来のものについては、WHO の BSE に関する勧告に従う。

[実験室の設備と操作]

6. リバーシ・ジェネティクス操作は、他のインフルエンザウイルスを取り扱う場所から隔別しているか、事前に消毒された実験室内の、セフティーキャビネット内で行う。トランスフェクション後には、適切なバイオセフティーレベルに応じた封じ込め対応が要求される。細胞培養は微生物等を用いた操作とは別の実験室で行う。

7. 可能であれば、操作は SOP に従って行う。すべての操作は、操作記録に残す。使用したすべての材料の製品番号を記録する。実験室記録には、交叉汚染を防ぐために、他のインフルエンザや遺伝子材料を同時に取り扱いしていないことの証明を銘記する。

WHO Recommendations for the Development of Influenza Vaccine Reference Viruses by Reverse Genetics

DRAFT (2005-03-07)

1. Introduction

The World Health Organization reviews the world epidemiological situation for influenza twice annually and, if necessary, recommends new influenza vaccine strains. Following the WHO Recommendations, it is usually necessary to develop vaccine reference viruses which have the antigenic properties of the WHO strain, but with improved growth properties for more efficient vaccine production. For more than twenty years, high growth reassortant influenza viruses have been prepared by infecting an embryonated hen's egg with the wild type recommended strain and A/PR/8/34, a laboratory adapted virus that grows to high titre in eggs. The goal has been to generate reassortants that contain six gene segments from A/PR/8/34 virus plus the haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) gene segments of the newly-recommended wild type strain (6:2 reassortants).

In recent years, plasmid-based reverse genetics has been applied to the rational development of influenza virus high growth reassortants [1-7]. In each case, 6:2 reassortants were created in which the HA and NA segments were derived from a variety of wild type viruses including H1N1, H3N2, H5N1 and H5N3 human and avian viruses with the remaining six segments from PR8. The reverse genetics process involves the use of mammalian cells and, during development of the technology, 293T cells, 293T/MDCK cell mixtures and Vero cells have been used. However the requirement for a mammalian cell in the reverse genetics process imposes specific regulatory requirements when the rescued virus is intended for use in the development of human vaccine.

Reference viruses are not subject to the comprehensive regulatory requirements that apply to vaccines as they are not part of vaccine manufacture *per se*. However, as they are often used for the development of human vaccine seed viruses, appropriate procedures should be followed in their preparation to ensure an adequate level of quality and safety. The guidance provided below is to ensure clarity and worldwide consistency in the procedures used to develop and test human influenza reference viruses produced by reverse genetics, and has been developed after consultation with WHO Collaborating Centres for Influenza, regulatory agencies and vaccine manufacturers.

2. Materials used in reverse genetics

2.1 Wild type influenza virus

Traditional reassortant viruses are derived only from wild type viruses isolated and grown in hens' eggs, or in a validated clean cell culture system. All other systems may harbour unknown contaminants that could adversely affect the quality of the reassortant virus. However, in deriving a reassortant by reverse genetics, any source of influenza virus genetic material is acceptable, as any potential contaminant of the virus isolation system, or present in the clinical sample, will be eliminated during the molecular cloning step. Thus, the originating wild type virus for a reverse genetics based reassortant may be derived from eggs, non-validated mammalian cell culture, or directly from clinical material.

The wild-type virus should be handled under appropriate conditions for an infectious agent (see

especially, section 5). It should also be characterized by a WHO Collaborating Centre for Influenza as antigenically suitable for vaccine virus development.

2.2 Cells

Mammalian cells may harbour microbiological contaminants that could adversely affect the quality of a reference virus and subsequent vaccine seed. Consequently, cells for use in deriving vaccine reference viruses by reverse genetics should be validated to be free of undesirable contaminants, as determined by the national control authority. Cells validated for human vaccine production are the most appropriate.

The cells should be based on a cell bank system. Cells used for the reverse genetics process should be passaged minimally from the cell bank and, for cells specifically validated for vaccine production, within the maximum number of passages permitted for vaccine production. Culture media and other materials used for cell propagation should comply with the guidance given below in section 2.3.

Concerns regarding oncogenic DNA contamination from transformed cell lines are minimal since any such DNA will be diluted out during subsequent passage of the reference virus in eggs, or in cells validated for vaccine production.

Reassortant viruses derived in laboratories where approved cells have not been used, are not recommended for use in the development of vaccine seed viruses.

Initial demonstrations of the use of plasmid-based reverse genetics for the derivation of reassortants made use of 293T or 293T/MDCK cells [1-4]. 293T cells, while optimal for reverse genetics, are not validated for the preparation of human vaccine and so viruses derived on them should not be used for this purpose. Of alternative cell systems available, the most suitable appears to be Vero cells, banks of which have been approved for the production of human vaccines. Vero cells have been shown to be amenable to the reverse genetics process [5-8] and reference viruses specifically for use in human vaccine development have been prepared using validated Vero cells [6,7]. Development of other cell lines that may be appropriate for use in reverse genetics and in human vaccine production is being pursued.

Additional guidance related to considerations for tissue cultures and materials used to support tissue cultures used for vaccine production can be found in the WHO cell substrate guideline [9].

2.3 Reagents

All reagents used for the reverse genetics derivation of a reference virus should be of good quality. This includes materials used for cell propagation, bacterial growth media, reagents used for plasmid DNA purification and reagents used during cell transfection and virus rescue. All products of animal origin (especially bovine sourced material) used in the preparation of a reference virus should be from an acceptable source and comply with WHO recommendations on Transmissible Spongiform Encephalopathies [10]. All steps should be carefully scrutinized for the origin of their component parts. Typical reagents that are, or may contain, materials of animal origin are bovine serum used in cell media, porcine trypsin used in cell propagation, bacterial growth media, RNase used during plasmid DNA purification and bovine serum albumin used during virus recovery. Animal products used for cell propagation (serum and trypsin) should preferably be irradiated or otherwise treated to inactivate potential viral contaminants. The use of animal-free components should be explored.

3. Laboratory facilities and procedures

Reverse genetics procedures should be carried out in a Microbiological Safety Cabinet within a laboratory area which is either separate from other influenza virus activities or which can be disinfected before work commences. After transfection of cells with plasmid DNA, the cells must be considered as infectious and, depending on the virus being rescued, should be kept at an appropriate level of biological containment.

Cells for use in reverse genetics should be cultivated in a clean laboratory designated for cell culture and separate from work with biological agents.

Wherever possible, procedures should be conducted according to SOPs. All activities associated with the derivation and characterisation of a vaccine reference virus, viz., cloning of the HA and NA genome segments, plasmid DNA preparation, cell culture, reverse genetics, virus propagation and all analytical tests should be recorded in laboratory notebooks. Records should be kept of all batch numbers for materials used. Laboratory records should include documentation that no other influenza viruses or their genetic material are handled at the same time as the rescue work in order to avoid cross contamination.

4. Characterisation of the reference virus

The antigenic character of the reference virus should be assessed and shown to be identical to that of the wild type virus from which the HA and the NA segments were obtained. The nucleotide sequence of the HA and NA genes of the reference virus should be determined and should be compared with the sequence of the respective clones and of the genes from the original wild-type virus. Any differences should be noted. An assessment of the level of residual plasmid in the reference virus should be made using e.g. PCR technology.

The virus titre should be determined in the appropriate substrate.

The reference virus should be tested for bacterial and/or fungal contamination using normal procedures.

A protocol should be prepared, summarising virus development and documenting the items listed above in sections 2-4.

The virus should also be assessed by a WHO Collaborating Centre for Influenza to conclude that antigenic and genetic characteristics are suitable for use as a vaccine reference virus.

5. Development of a reference virus from highly pathogenic influenza viruses

Work with highly pathogenic influenza viruses should take place at a high level of biological containment (e.g. BSL3+ or 4 as advised by WHO and national safety authorities).

Reverse genetics technology can be used to eliminate the HA pathogenicity motif (multibasic amino acids at the HA cleavage site) and produce a virus with properties suitable for large-scale vaccine manufacture.

The tests performed to demonstrate that a virus derived by reverse genetics is no longer pathogenic have been described by the WHO [11] and include a chick embryo lethality test, a chicken pathogenicity test, a ferret pathogenicity test and sequencing.

All the above considerations on source materials, derivation and characterisation (sections 2-4) also apply to a reference virus derived from a highly pathogenic influenza virus.

6. References

- [1] Schickli JH, Flandorfer A, Nakaya T, Martinez-Sobrido L, García-Sastre A, Palese P. Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356:1965-1973.
- [2] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 2002; 20:3165-3170.
- [3] Subbarao K, Chen H, Swayne D, Mingay L, Fodor E, Brownlee G, Xu X, Lu X, Katz J, Cox N, Matsuoka Y. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* 2002; 305:192-200.
- [4] Liu M, Wood JM, Ellis T, Krauss S, Seiler P, Johnson C, Hoffmann E, Humbert J, Hulse D, Zhang Y, Webster RG, Perez DR. Preparation of a standardised, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. *Virology* 2003; 314:580-590.
- [5] Ozaki H, Govorkova EA, Li C, Xiong X, Webster RG, Webby RJ. Generation of high-yielding influenza A viruses in African Green Monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics. *J Virol* 2003; 78:1851-57.
- [6] Webby RJ, Perez DR, Coleman JS, Guan Y, Knight JH, Govorkova EA, McClain-Moss LR, Peiris JS, Rehg JE, Tuomanen EI, Webster RG. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004; 363:1099-1103.
- [7] Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. (2005) Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine*, in press.
- [8] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, García-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 1999; 73:9679-9682.
- [9] Requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals. (Requirements for Biological Substances No. 50). WHO Expert Committee on Biological Standardization; 47th report. WHO Technical Report Series, No. 878, 1998, pp 19-52.
- [10] WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products. Blood Safety and Clinical Technology Department document. <http://www.who.int/biologicals/Meeting-Reports/Doc/whotse2003.pdf>
- [11] WHO document on 'Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment'. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/pandemicvaccines/en/print.html>

D. 考察

今回まとめた最終案に沿って、我が国におけるインフルエンザワクチン製造株の開発に関するガイドラインを作製する必要がある。

特に、BSL3 の H5N1 ウイルスにおけるリバーシ・ジェネティクス操作は、外部への汚染防止というバイオセフティーの規制と、外部からの混入汚染の防止という品質保証の規制の、お互いに矛盾する条件を満足させねばならず、この解決は技術的にも容易ではない。前者については BSL3 実験室が要求され、後者については GMP に準じた構造施設と運用が要求される。

この両者を満足させる施設は、我が国には存在しない。そこで、来年度において、感染研にこのような施設の建設が予定されており、これによって、安全性と品質確保という両条件を満たす、インフルエンザワクチン製造株の開発が可能となろう。

E. 結論

最近、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバーシ・ジェネティクス）が開発されてきた。現在東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。しかし、この技術の使用法およびそれによるワクチン候補株の開発に関しては、特別な注意事項等がなく、安全性に関する規制の必要性が指摘されている。そこで、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Saito, T., W. Lim, and M. Tashiro. :Attenuation of a human H9N2 influenza virus in mammalian host by reassortment with an avian influenza virus. Arch. Virol 149:1397-1407, 2004

Saito, T., Nakaya, Y., Suzuki, T., Ito, R., Saito, T., Saito, H., Takao, S., Sahara, K., Odagiri, T., Murata, T., Usui, T., Suzuki, Y., and Tashiro, M. :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

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

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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）
研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

研究者 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

研究要旨： 近年、アジアを中心に高病原性 H5N1 鳥インフルエンザが流行している。タイ、ベトナム、カンボジアではヒトにも感染し、2003 年末以降、40 人以上の死亡が報告されている。本邦でも、山口、大分、京都にて家禽への感染が発覚した。幸い日本国内での流行は終息したが、国内分離株はタイやベトナムの株と抗原性が若干、異なることが報告され、再流行への事前対策の一環として国内分離株に対するワクチン株の作製が重要であると考えられる。そこで、強毒株の流行に対処する新たなワクチン開発法として注目されているリバースジェネティクスにて、山口県での分離株を用いワクチン株の作製を試みた。得られたウイルスは、発育鶏卵においてよく増殖した。すなわち、リバースジェネティクスを用いて、日本国内分離株に対するワクチン候補株を作製することができた。

A. 研究目的

近年、アジアにて高病原性 H5N1 鳥インフルエンザが大流行し、タイ、ベトナム、カンボジアでは、ヒトへの感染が報告され高い致死率が示された。日本国内においても、山口、京都、大分の家禽での流行が報告された。近年のアジアにおける高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行拡大によるパンデミックウイルスの出現が危惧されているが、抗原性の一致したワクチンをいかに迅速に供給できるかが重要である。国内分離株の抗原性はタイやベトナムの分離株と若干異なることが判明し、国内分離株に対するワクチン候補株の作製が重要であると考えられる。しかし、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスは、発育鶏卵を殺すため、従来のワクチン製造方法では高質なワクチンの製造が困難である。更に製造者のバイオセーフティの観点からも問題がある。そこで、近年注目されているリバースジェネティクス法を用いて山口分離株の弱毒改変型組換えウイルスの作製を試みた。

B. 研究方法

A/Yamaguchi/7/04 (H5N1) の HA および NA 分節をリバースジェネティクス用 pPol I プラスミドにクローニングした後、HA の開裂部位配列 (RERRKKR) を三種類の弱毒型配列 (----RETR,

----TETR, あるいは IETR) に改変した。これら改変 HA および NA と、それ以外の遺伝子が A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1) 由来のウイルスを、293T 細胞を用いてリバースジェネティクス法により作製した。作製したウイルスを発育鶏卵で増殖させ、48 時間後に回収した漿尿液の EID₅₀/ml (50% 発育鶏卵感染価) を算出し、発育鶏卵での増殖性を評価した。

C. 研究結果

PR8 を遺伝的背景に持つ組換えウイルスは、いずれも発育鶏卵でよく増殖し、感染 48 時間後の漿尿液にて、 $10^{8.5}$ EID₅₀/ml のウイルス産出が認められた。

D. 考察

ワクチン株は、発育鶏卵でよく増殖し、かつ弱毒型でなくてはならないが、今回、その条件を満たすワクチン株を作製することができ、日本国内分離株に対するワクチン開発につながった。

E. 結論

リバースジェネティクスを用いることにより、日本国内分離株 (A/Yamaguchi/7/04 [H5N1]) の発育鶏卵における病原性を弱め、さらに発育鶏

卵でよく増殖するワクチン株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 vRNA segments of influenza A virus. The Awaji International Forum an

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、20004