

Tanabayashi, Akitoyo Hotta, Takehiko Saito, Akio Yamada and Mutsuo Kobayashi. Detection and Isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2006, in press).

2) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 林利彦, 津田良夫, 倉橋弘, 棚林清, 堀田明豊, 山田章雄, 西藤岳彦, 小淵正次, 田代真人, 小林睦生. 2004年高病原性鳥インフルエンザ国内流行地で採集されたクロバエ類からのH5N1亜型インフルエンザウイルスの検出と分離. 病原微生物検出情報, 26: 119-121, 2005.

2. 学会発表:

1) 澤邊京子. クロバエ類からの高病原性トリインフルエンザウイルスの検出と分離. 第57回日本衛生動物学会大会シンポジウム. 6月. 札幌市(2005)

2) 澤邊京子, 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 倉橋弘, 主藤千枝子, 棚林清, 堀田明豊, 山田章雄, 小林睦生. オオクロバエ体内におけるH5N1インフルエンザウイルスの生存に関する研究. 4月. 長崎市(2006)

#### Ⅲ. 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

表1. クロバエへのウイルス摂食実験 1: クロバエのそ嚢および腸管からのインフルエンザウイルスの分離

Hours and days postexposure	Virus isolation <sup>b</sup>		
	Crop	Gut	Out of fly <sup>c</sup>
3h	2/3	2/3	—
6h	2/3	0/3	0/3
9h	2/3	1/3	0/3
24h	1/3	0/3	0/3
72h	0/3	0/3	0/3
6d	0/3	0/3	0/3

<sup>a</sup> オオクロバエに約 $10^8$  (TCID<sub>50</sub>/ml)のH5N1インフルエンザウイルス弱毒(A/duck/Hyogo/35/01)を含む発育鶏卵しょう尿膜腔液を約3時間摂食させた。

<sup>b</sup> それぞれ2個の発育鶏卵に各処理区から作成したウイルス乳剤0.2mlを接種し、3日後にHA-testあるいはDirectigen FluA+B kitで判定し、少なくとも1個の発育鶏卵で分離が成功した検体を陽性と判断した。

<sup>c</sup> クロバエ体表はMEM培養液で洗浄し、フラスコ内壁に付着したクロバエの吐出物および排泄物も同様にMEM培養液で洗浄し湿和した。

表2. クロバエへのウイルス摂食実験 2: クロバエのそ嚢および腸管からのインフルエンザウイルスの分離とMDCK細胞培養系から算出されたウイルスtiter

Hours and days postexposure	Virus isolation <sup>a</sup> (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0.05ml)		
	Crop	Gut	Out of fly <sup>b</sup>
3h	10/10 (3.15±1.12) <sup>c</sup>	10/10 (2.91±1.2)	—
6h	2/3 (<0.5) <sup>d</sup>	2/3 (2.50±1.41)	0/3
9h	2/3 (1.0)	2/3 (1.0)	0/3
24h	1/3 (1.67)	1/3 (<0.5)	0/3
48h	0/3	0/3	1/3 (<0.5)
14d	0/3	0/3	0/3
14d (10°C)	0/3	0/3	0/3

<sup>a, b</sup> ウイルス分離およびクロバエ体表およびフラスコ内壁洗浄液の回収は実験1の通り。

<sup>c</sup> 各処理区より作成したウイルス乳剤はMDCK培養細胞に接種後CPEを観察し、ウイルスtiterはReed-Muench法により算出した。各処理区での検出可能な値を対象にMeans±SDを示した。

<sup>d</sup> <0.5は検出限界以下

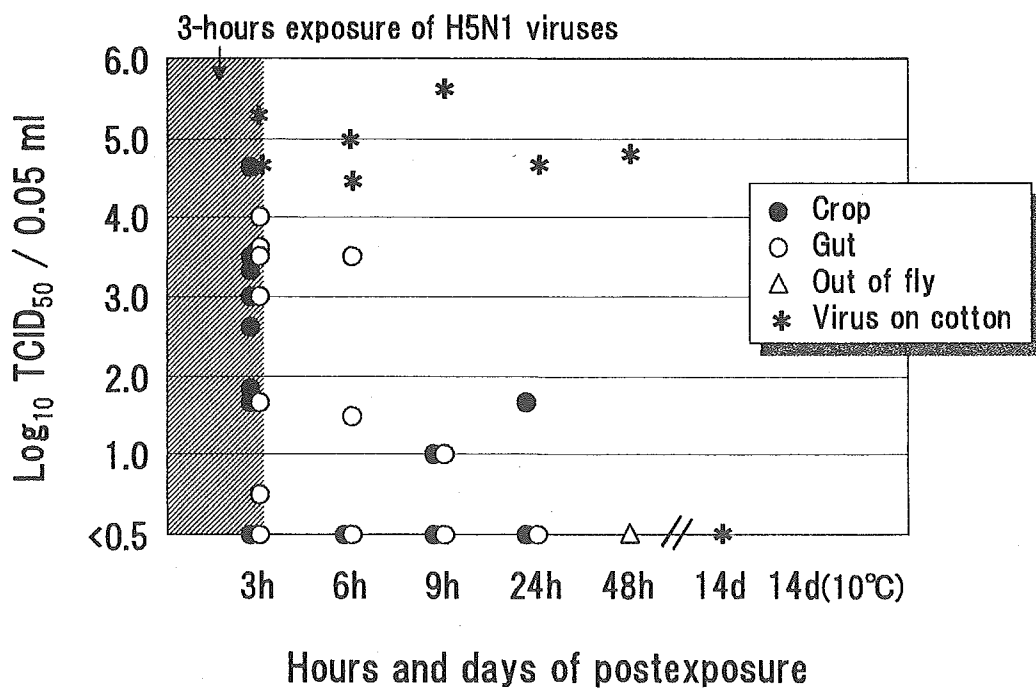


図 1. クロバエへのウイルス摂食実験 2: MDCK細胞培養系から算出されたウイルスtiter

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
新型インフルエンザへの事前準備と大流行発生時の緊急対応計画に関する研究  
平成 17 年度分担研究報告書

新型ウイルスの感染病理機構と予防法・治療法の開発

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：尾崎泰子、一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

**研究要旨** 高病原性トリインフルエンザ H5N1 のヒトへの感染が拡大する中ヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。本研究において 2004 年ベトナムにおいてヒト死亡例から分離された強毒型 H5N1 株 A/VN/1194/2004 を用い哺乳類に対する病原性をマウス感染モデルを用いて病理学的に解析を行った。本株はマウスにおいて神経向性が強いウイルスであった。また同株よりリバーシジェネティック法で弱毒化されたワクチン株を用いホルマリン不活化全粒子ワクチンのアジュバント併用経鼻ワクチンによりその有効性と交叉防御能を調べ、同ワクチンを合成 dsRNA である poly(I:C) をアジュバントに用いる事により完全防御に必要な鼻腔内 IgA、血中 IgG が誘導される事がわかった。またこの免疫法により免疫されたマウスは 1997 年香港で分離された強毒 H5N1 株 H5N1 A/Hong Kong/483/97 の攻撃感染に対しても有意にウイルス価を減少させ 100% の生存率が得られた。

## A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパにまで広がり現在までに 88 人のヒトの死亡例が出ている。本ウイルスがヒトからヒトへ伝播する新型インフルエンザの元となる新型インフルエンザ出現の脅威となっている。現在アジアを発端として流行している高病原性鳥インフルエンザの哺乳類での病原性を解析しその有効な予防法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

### 材料と方法：

ウイルス株及びワクチン株

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 (A/VN/1194/2004, A/HK/483/97) を用いてマウス感染実験を行った。ワクチン株としてはリバーシジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1) の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

## ウイルス感染

A/VN/1194/2004 及び A/HK/483/97 株ウイルスを 1,000pfu 及び 10,000pfu を片鼻 2 $\mu$ l ずつ両鼻腔内に接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL3 動物実験施設でおこなった。

## アジュバントの調整

合成二本鎖 RNA (polyI:C) は株式会社東レより分与を受けた。

## 免疫方法

7 週齢の BALB/c マウス(雌)を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 0.1~1 $\mu$ g のワクチンを 0.1~10 $\mu$ g の poly(I:C) アジュバント、と共に経鼻投与した。4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織(NALT) および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

## ELISA アッセイ

遺伝子を改変した H5HA に対する IgA および IgG 抗体価の測定は、ELISA にておこなった。免疫に用いたワクチン抗原を ELISA プレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgA ( $\alpha$ 鎖) または IgG ( $\gamma$ 鎖) を反応させた。アルカリホスファターゼーストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ吸光度を測定した。あらかじめ精製した H5-HA 反応性の IgA と IgG を任意の単位

(160U)のスタンダードとして用い、2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

## 病理

攻撃感染後 7 日目のマウスについて、脳、鼻腔、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸の病理学的変化を観察した。各組織の切片を HE 染色および A 型ウイルスの NP に対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色をおこなった。

## 結果

1、ヒトから分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN/1194/2004 株の哺乳類での病原性

2004 年ベトナムのヒト感染例がら分離された高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 A/VN/1194/2004 の哺乳動物での感染の広がり と病原性について BALB/c マウスを用いて感染実験を行い、経時的にウイルスの広がりを追跡し各臓器でのウイルス価と病理学的な検索を行った。感染には最初の感染を鼻腔に限局した感染とする為に片鼻 2\_1とした。ウイルスの広がりがみられた各臓器でのウイルス価の変化を図 1 に病理組織像を図 4 に示した。

ウイルス接種部位である鼻腔においてウイルスは感染 5 日目をピークに、鼻腔洗浄液 1ml に対し 10<sup>4</sup>pfu まで上昇し局所での感染は 10 日目までに減少していった。一方肺では感染 3 日目ではウイルスが認められず 5 日目以降上がってくる。また特徴として感染の早い時期に頸部リンパ節で感染性ウ

ウイルスが同定されている。このウイルスはいままで報告されている A/HK/483/97 と同様に神経向性が強くみられ感染末期には後肢の麻痺などの神経症状を呈して死亡する。

神経系へのウイルスの広がりには最初に三叉神経節でウイルスの増殖がみられ続いて脳幹部へ広がっている。マウス死亡時の脳幹でのウイルス価は他の神経に比べ高い。また、驚いた事に鼻腔と直接臭神経を介して交通している嗅球や大脳の前頭葉ではウイルスがまったく同定されなかった。このことは鼻腔から脳へのウイルスの広がりが臭神経を介さず、三叉神経を介して脳幹、さらに脳へと広がっていくと考えられる。

また、本株においては他の高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)で報告されたような全身感染はみられず、肝臓、脾臓、腎臓、消化管では感染性ウイルスが認められなかった。

## 2, poly(I:C)併用 H5N1 不活化全粒子ワクチン経鼻投与による感染防御

高病原性鳥インフルエンザウイルスによる感染を防御する目的でアジュバント併用経鼻不活化ワクチンによる感染防御を試みた。ワクチンとしてリバーズジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1)の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを用いた。アジュバントには Toll-like receptor3 (TLR3)や細胞質内 RNA Helicase である RIG-I のリガン

ドとして知られる合成 double stranded RNA である poly(I:C)を用いた。鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA 抗体濃度及び血清中の IgG 抗体濃度、チャレンジ後の鼻腔洗浄液中のウイルス価および生存率を図 2 に示す。不活化全粒子ワクチン 1<sub>g</sub> と共に poly(I:C)を 10<sub>g</sub> 1<sub>g</sub> 0.1<sub>g</sub> を経鼻投与した場合、または poly(I:C) 10<sub>g</sub> と不活化全粒子ワクチンを 0.5<sub>g</sub> と共に経鼻投与したとき有意に鼻腔洗浄液中の H5N1(A/VN/1194/2004)特異的分泌型 IgA が上昇しさらにチャレンジ後の鼻腔洗浄液中のウイルス価が検出限界以下に抑えられた。それらの群におけるマウスの生存率は 100%であった。一方、ワクチンなしのアジュバントのみを投与した群においては抗体は誘導されず生存率は 0%であった。また同量のワクチン及び poly(I:C)を皮下接種した群においては血清中の H5N1(A/VN/1194/2004)特異的 IgG が誘導されているが鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA は認められなかった。ワクチン株と同型のウイルスによる攻撃感染実験では皮下接種においても生存率は 100%であった。

## 3, 高病原性鳥インフルエンザ経鼻不活化ワクチンによる交叉防御

経鼻インフルエンザワクチンの H5N1 亜型内の交叉防御能を調べる為、H5N1(A/VN/1194/2004)株由来ワクチンを経鼻及び皮下接種しその後 H5N1

(A/HK/483/97) 株による攻撃感染実験を行った(図 3)。鼻腔洗浄液中の H5N1 特異的 IgA 抗体は皮下接種群では見られず経鼻接種群にのみ認められた。血中の H5N1 (A/VN/1194/2004)特異的 IgG 抗体価は経鼻

接種皮下接種群両方で認められた。

抗原性の異なる H5N1 (A/HK/483/97) 株による攻撃感染での生存率は非免疫群が 0%皮下接種群が 80%経鼻接種群が 100%となった。Poly(I:C)アジュバント併用 H5N1 経鼻不活化全粒子ワクチン接種により流行年が 7年違うウイルスに対し交叉防御が示された。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所 戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

#### D. 考察

ヒトへの感染もアジアに留まらずヨーロッパに広がりつつある高病原性鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への病原性を 2004 年ヒト感染例から分離された H5N1 A/VN/1194/2004 株を用いて調べた。マウスの鼻腔内に局限した感染法を用いたが、肺等の呼吸器に留まらず強い神経向性を示し、三叉神経節、脳幹部へ感染が広がり 10 日～14 日で死亡した。興味深い事に鼻腔と臭神経と交通している前頭葉への感染の広がりは見られず、三叉神経への親和性が強いウイルスであることが示された。また、合成 Double stranded RNA をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 IgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導され高病原性鳥インフルエンザに対しても有効な方法であった。新型インフルエンザに備えたワクチン開発において最も重要な事は流行が起こってからでないとその流行株を種にしたワクチンを作製できない事である。

流行が起こってからではワクチンが行き渡るまでに時間がかかり手遅れになる可能性もある。そこでワクチン株だけでなくある程度の交叉防御能をもつワクチン法の開発が急務である。交叉防御能をもつワクチンを接種しておくことと流行株と必ずしも抗原性が一致しない場合でもある程度の防御が可能である。今回我々が行った研究はその可能性を示唆する結果である。アジュバントと共にワクチンを経鼻接種することにより交叉防御能を有する分泌型 IgA が誘導され、同じ亜型内の抗原性の異なるウイルスの致死感染に対しても 100%の生存率が示せた。経鼻ワクチン接種によって交叉防御能を持つ IgA は鼻腔のみでなく全身の粘膜に分泌される事が知られている。高病原性鳥インフルエンザはその感染が呼吸器に留まらず、消化管を含めた全身にその感染が広がる可能性が高い。そういう意味でも粘膜経由の免疫法は特に高病原性鳥インフルエンザに対して有効であると考えられる。

#### E. 結論

高病原性インフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルでの病原性を調べ更にアジュバント併用経鼻 H5N1 ワクチンの有効性を示してきた。ワクチンの経鼻投与による粘膜免疫誘導が特に高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の病態において交叉防御の観点から有効である事が示された。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2005 Jan; 75:130-136.
2. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H\*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 2005 Mar;79(5):2910-9.
3. Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 2005 Jun;66(2-3):159-63. Epub 2005 Feb 19.
4. Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda M, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hiramata C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, and Kojima A. An Attenuated LC16m8 Smallpox Vaccine: Analysis of Full-Genome Sequence and Induction of Immune Protection. *Journal of Virology*. 2005 79:11873-11891
5. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-

Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine in press*.

6. Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H, Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

### 学会発表

1. 一戸猛志、尾崎泰子、板村繁之、田村慎一、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの有効性の検討 第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪
2. 田村慎一、尾崎泰子、長谷川秀樹、谷本武史、鈴木雄次郎、山本三郎、佐多徹太郎、倉田毅 経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪
3. 石井孝司、横田恭子、大西和夫、竹森利忠、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、水谷哲也、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討 第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪
4. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、加藤篤、網康至、田代真人、小船富美夫、倉田毅、佐多徹太郎 弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験に用いる動物モデルの開発ー各種実験動物におけるムンプスウイルスの感受性についての病理学的検討ー第 9 回日本ワクチン学会学術集会 平成 17 年 10 月 15 日-16 日 大阪

5. 一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、  
田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹  
NKT 細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導  
と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対す  
るワクチンへの応用 第 53 回日本ウイルス  
学会学術集会 2005 年 11 月 20-22 日 横浜
6. 山本典生、松本武久、森川茂、長谷川秀樹、  
永田典代、山本直樹 In silico screening によ  
る SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定  
第 53 回日本ウイルス学会学術集会 2005 年 11  
月 20-22 日 横浜
7. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀  
悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太  
郎 マウス、ラットを用いた継代による  
SARS-CoV の病原性の変化 第 53 回日本ウ  
イルス学会学術集会 2005 年 11 月 20-22 日  
横浜
8. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、  
水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、鈴  
木哲朗、宮村達男 高度弱毒化ワクチニアウ  
イルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとして  
の検討 第 53 回日本ウイルス学会学術集会  
2005 年 11 月 20-22 日 横浜

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

経鼻ワクチン（感染研発277号）出願中



図1 経鼻感染後の H5N1(A/VN/1194/2004)株の広がり

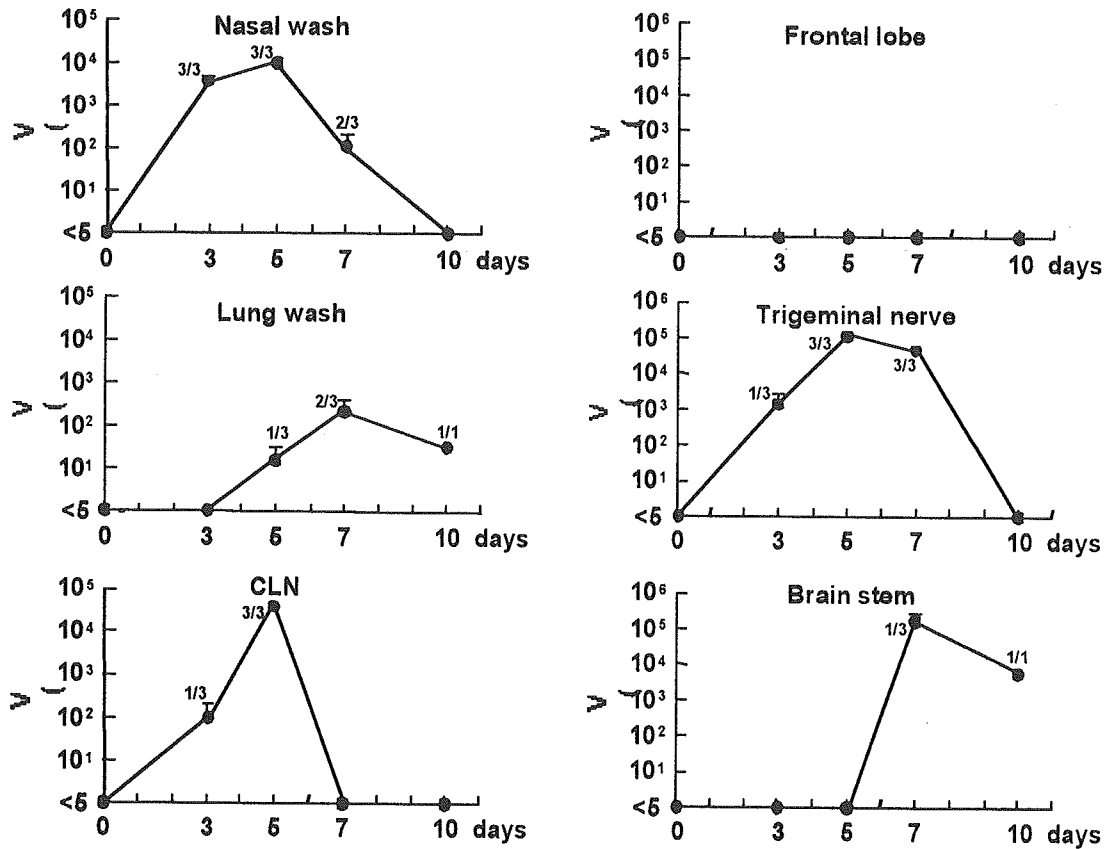
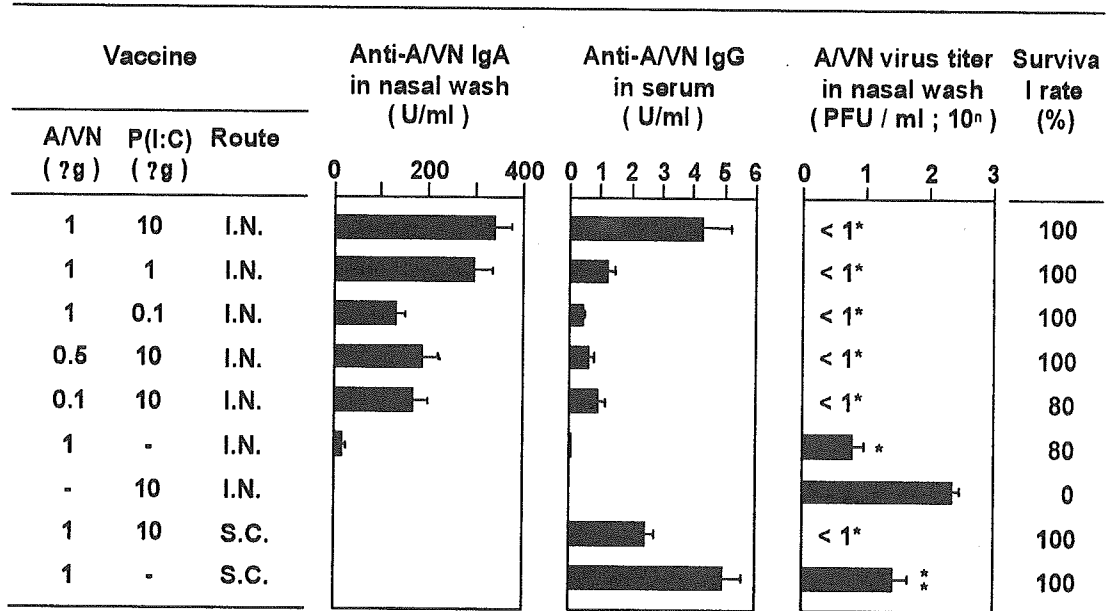


図2 経鼻不活化ワクチンによる粘膜免疫誘導と感染防御



\* : p < 0.01  
\*\* : p < 0.05

図3 経鼻不活化ワクチンによる交叉防御

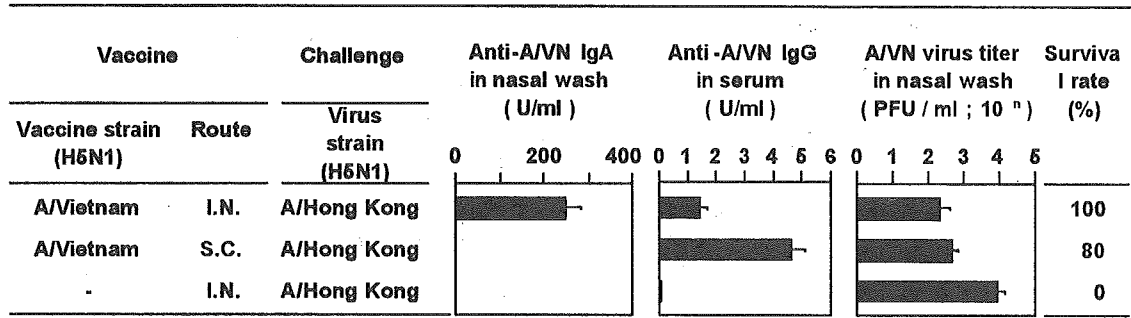
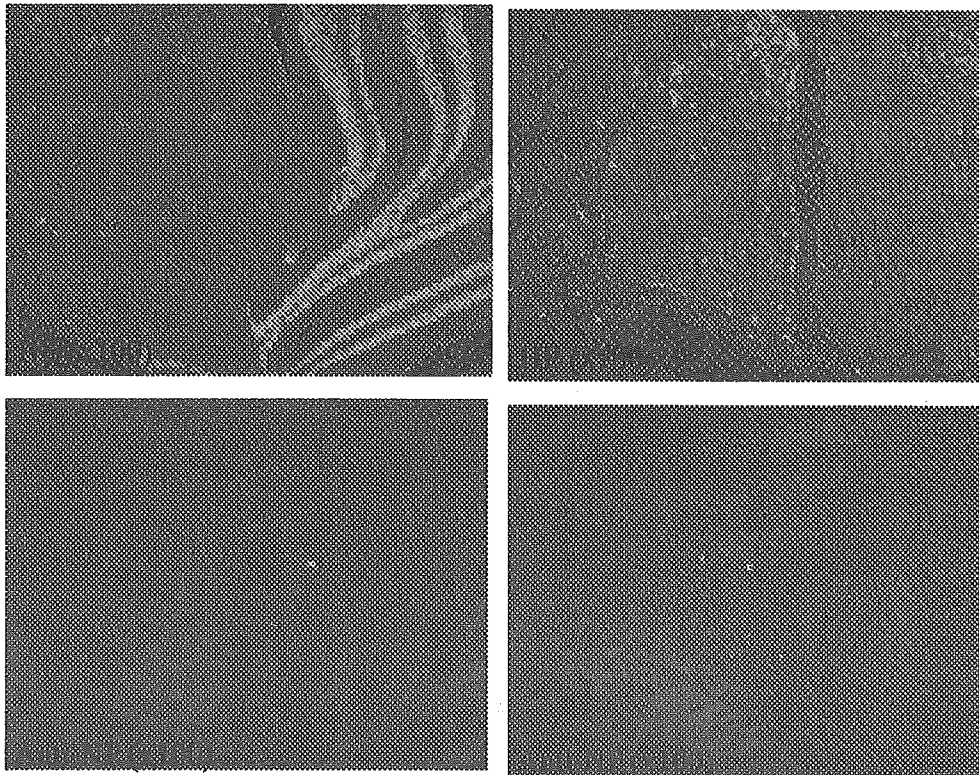


図4 脳幹部及び三叉神経節の病理組織像



新型インフルエンザウイルス監視システムおよび H5 鳥インフルエンザウイルス診断法の開発

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 影山努、小淵正次、今井正樹、二宮愛、板村繁之、斉藤利憲

(国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室)

**研究要旨** 新型インフルエンザが出現すると、ほとんどの人は新型インフルエンザウイルスに対する免疫を持たないため、世界的な大流行（パンデミック）となり、大きな健康被害とこれに伴う社会破綻をきたすことになる。新型インフルエンザの被害を最小限に抑えるためには、新型インフルエンザウイルス早期検出サーベイランス体制の強化が必要である。本研究では、最近の流行株も検出できるよう H5 亜型鳥インフルエンザ検出の RT-PCR 法の改良と、新型インフルエンザに対応した新しいサーベイランス体制のための新受付管理システムの構築を行った。

## A. 研究目的

2003 年末から東南アジア地域を中心に高病原性 H5N1 鳥インフルエンザが流行し、感染地域はさらに中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと拡がりをみせている。また、ヒトへの感染および死亡事例も依然として増え続けており、ヒトからヒトへの感染を疑わせる事例もいくつか報告されている。この H5N1 鳥インフルエンザウイルスがヒトの新型インフルエンザウイルスへと変化し、ヒトからヒトへ拡がり始めると、ほとんどの人は新型インフルエンザウイルスに対する免疫を持っていないため、世界的な大流行（パンデミック）となり、大きな健康被害とこれに伴う社会的影響を受けることになる。このように新型インフルエンザ発生の危険性が高まってきているなかで、パンデミック時の被害を最小限に抑えるには事前対策を万全にしておく必要がある。

現在、ヒトで流行しているインフルエンザ（A ロシア型、A 香港型、B 型）に対するサーベイランスは、定点観測医療機関で臨床検体を採取し、地方衛生研究所でウイルス分離と型（亜型）および大まかな抗原変異の程度が解析され、WISH 感染症検査情報オンラインシステムを通じて、感染症情報センターにその結果が蓄積される体

制となっている。感染研インフルエンザ室へは週毎に、感染症情報センターより情報が提供され、当室のインフルエンザ情報受付管理システム（受付管理システム）で情報を処理し、より詳細な抗原解析および遺伝子解析が行われる。本研究では、新型インフルエンザも含め、リアルタイムに流行を監視できるように、新しいサーベイランスシステム体制を構築する事を目的とした。

さらに、感染研情報センターホームページに掲載した現行の H5N1 高病原性鳥インフルエンザの感染診断用に開発した RT-PCR 法では、2005 年から茨城県を中心に発生した H5N2 弱毒型鳥インフルエンザウイルスの検出ができないことが判明した。そこで本研究では、現行の RT-PCR 法を変更し、国内で流行している H5N2 鳥インフルエンザを含めた H5 亜型鳥インフルエンザを高感度および特異的に検出できる検出系の改良を行った。

一方、新型インフルエンザの出現を予測するには、最新の鳥インフルエンザウイルスの性状を解析する事が重要である。本研究では、ベトナムおよびインドネシアから分離された最近の H5N1 高病原性鳥インフルエンザ株について性状解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 新たなインフルエンザサーベイランス体制の構築

平成 18 年度より WISH 感染症検査情報オンラインシステムは新システムに移行し、より多くの情報がリアルタイムに利用可能となるが、現行の受付管理システムのままでは、新システムの利点を生かした活用ができない。また、現行の受付管理システムは一般的なヒトのインフルエンザを対象としているので、新型インフルエンザサーベイランスに対応させるためにも、受付管理システムの全面的な見直しが必要不可欠となってきた。そこで新型インフルエンザも含め、リアルタイムに流行を監視できるように、新しいサーベイランスシステム体制を構築する事を目的として、新たに受付管理システムの構築を行った。

### 2. RT-PCR 法の改良

2005 年の国内での H5N2 鳥インフルエンザの流行に際して、我々は、分離された H5N2 インフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列を基にして、新たにプライマーを設計し、その亜型特異性および RT-PCR の検出感度について検討した。

### 3. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの性状解析

2005 年に H5N1 ウイルス感染が疑われる患者から採取した検体をベトナムから入手し、RT-PCR 法による H5N1 鳥インフルエンザウイルス検出を行った。また、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い、分離したウイルスについては性状解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 新たなインフルエンザサーベイランス体制の構築

新 WISH 感染症検査情報オンラインシステムは平成 18 年 4 月以降に運用される。また、新受付管理システムの構築により、これまで感染症情報センター経由で週単位に提供されてきたデータ情報が、当室でリアルタイムに直接利用可能となる。また、これまでの受付管理システムでのデータの授受は、システムの都合上電話回

線を利用したダイアルアップのみであり、しかもデータを授受するだけの一方通行であった。しかし、新受付管理システム移行後は専用回線を利用するので、リアルタイムに双方向での情報伝達ができ、迅速な情報共有が可能となる。

### 2. RT-PCR の改良

改良したプライマーを用いた RT-PCR 法により、2005 年から国内で発生した H5N2 弱毒型鳥インフルエンザも含め、最近の H5 亜型分離株から古い年代の H5 亜型分離株まで幅広くかつ高感度に検出する事が可能になった。なお、この改良法は感染研情報センターのホームページに「RT-PCR 法による H5 鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出（第 2 版）」として掲載し ([http://idsc.nih.go.jp/disease/avian\\_influenza/RTpcr.html](http://idsc.nih.go.jp/disease/avian_influenza/RTpcr.html))、地方衛生研究所や他機関での検査システムの改良に供された。

### 3. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの性状解析

2005 年にベトナムのホーチミン市にあるパストゥール研究所から検査依頼を受けた 4 検体について、RT-PCR 法および LAMP 法により検査を行った。その結果、2 検体の H5N1 鳥インフルエンザウイルス陽性例を検出し、そこから 2 株の H5N1 ウイルスが分離された。一方、ベトナムのハノイ市にある国立衛生研究所から検査依頼を受けた 129 検体についても検査したが、すべて H5 陰性であった。分離できた 2 株の H5N1 株について性状解析を行った結果、抗原性は WHO が推奨するプロトタイプワクチン株(A/VN/1194/2004)と類似しており、また、遺伝子解析により Z 型に分類される事が明らかになった。このことから、2005 年のベトナムの H5N1 ウイルスの流行株は 2004 年と較べて大きく変わっていない事が示唆された。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 ネットワーク間でも情報が共有された。

## D. 考察

東南アジアをはじめ、中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと拡がりを見せている高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの流行は当分終息しそうにない。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の対策を急ぐ必要がある。本研究では、最近の流行株の検出感度改善策として RT-PCR の改良を行い、最近の H5 亜型分離株から古い年代の H5 亜型分離株を、高感度に検出できるシステムの構築に成功した。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、パンデミック時の被害を最小限に抑えるには、流行の拡大を速やかに抑える必要がある。特にパンデミック開始当初はサーベイランス情報がほとんどないため、病原体サーベイランスのスピードアップを計り、より多くの情報を迅速に共有する事が非常に重要である。本研究により構築された新受付管理システムは、これまで週単位だったデータ情報が感染症情報センターによるデータ加工なしにいつでもリアルタイムに利用可能となり、地衛研から新型インフルエンザ感染者が報告された場合は、当室でも迅速にその情報を収集する事が可能となった。これにより、当室でもすぐに臨床検体を入手して、より詳細な解析を行う事ができるようになったことから、迅速なサーベイランス情報の提供が可能になった。本研究成果は、今後の新型インフルエンザ対策やパンデミック時のインフルエンザサーベイランスに大きく貢献するものと思われる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

R. O. Donis, Jean-Thierry Aubin, Saliha Azebi, Amanda Balish, Jill Banks, Niranjana Bhat, Rick A. Bright, Ian Brown, Philippe Buchy, Ana-Maria Burguiere, Hua-lan Chen, Peter Cheng, Nancy J. Cox, Aaron Curns, Frédérique Cuvelier, Guohua Deng, Julia Desheva, Stéphanie Desvaux, Nguyen Hong Diep, Alan Douglas, Scott F. Dowell, Nguyen Tien Dung, Lindsay Edwards, Keiji Fukuda, Victoria Gregory, Elena Govorkova, Alan Hampson, Nguyen Thi Hong Hanh, Scott Harper, Alan Hay, Erich Hoffmann, Diane Hulse, Masaki Imai, Shigeyuki Itamura, Samadhan Jadhao, Patricia Jeannin, Chun Kang, Jackie Katz, Jae-Hong Kim, Alexander Klimov, Yong-kuk Kwon, Chang-Won Lee n, Phuong Song Lien, Yi Pu Lin, Yanbing Li, Wilina Lim, Stephen Lindstrom, LaMorris Loftin, Jan Mabry, Taronna Maines, Jean-Claude Manuguerra, Masaji Mase, Yumi

Matsuoka, Margaret McCarron, Marie-Jo Medina, Doan Nguyen, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi, Takato Odagiri, Malik Peiris, Jean-Marc Reynes, James Robertson, Claudine Rousseaux, Takehiko Saito, Somchai Sangkitporn, Jean-Louis Sarthou, Michael Shaw, James M. Simmerman, M. Slomka, Catherine Smith, San Sorn, Erica Spackman, Klaus Stöhr, David L. Suarez, Haan Woo Sung, David E Swayne, Maryse Tardy-Panit, Masato Tashiro, Pranee Thawatsupha, Terrence Tumpey, Timothy Uyeki, Phan Van Tu, Sylvie Van der Werf, Robert Webster, John Wood Richard Webby, Xiyan Xu, Guan Yi

Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia *Emerging Infectious Diseases* 11, 1515-1521, 2005

Subash C. B. Gopinath, Tomoko S. Misono, Kazunori Kawasaki, Takafumi Mizuno, Masaki Imai, Takato Odagiri and Penmetcha K. R. Kumar An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* (in press)

Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro and Takato Odagiri Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine* (in press)

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses *Vaccine* (in press)

小田切孝人 インフルエンザウイルス流行の予測は毎年どのようにして行うのか *日医雑誌* 134, 1907-1910, 2006

### 2. 学会発表

Takato Odagiri Strain evolution of H5N1 avian influenza from Hong Kong 1997 to Vietnam/Thailand 2004/2005. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri Selection of vaccine strain for H5N1 influenza pandemic. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.

Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Masato Tashiro Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005

Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses Vaccine The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005

Takato Odagiri Development of H5N1 vaccine in Japan. US/Japan Cooperative Medical Science Program ARI Panel. 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Galveston, USA, January 24-25, 2006.

Takato Odagiri International responses of WHO influenza collaboration center in Tokyo on the outbreaks caused by highly pathogenic H5N1 avian influenza. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infectious Diseases-2006. Tokyo, February 19-20, 2006.

小田切孝人 2004/05 シーズンのインフルエンザ流行解析と次シーズンのワクチン 平成 17 年度衛生微生物技術協議会。福井市、7 月、2005

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第 9 回日本ワクチンワクチン学会 10 月、大阪 (2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人、駒瀬勝啓、多田善一、後藤修郎、池田富夫 インフルエンザパンデミックワクチン開発に関わる試作モックアップワクチンの調製およびその性状 第 9 回日本ワクチンワクチン学会 10 月、大阪 (2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザから新型インフルエンザへ 第 5 回日本バイオセーフ

ティー学会 横浜、11 月 (2005)

一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NKT 細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンへの応用 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、11 月 (2005)

小淵正次、今井正樹、小田切孝人 B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白膜貫通領域の機能解析 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、11 月 (2005)

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、西藤岳彦、田代真人 2004/05 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 17 年度のワクチン株 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、11 月 (2005)

二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 2004 年 H5N1 型高病原性鳥インフルエンザ分離株を用いたアルムアジュバント添加弱毒化ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、11 月 (2005)

板村繁之、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザへの対応ーワクチンの開発・準備 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、11 月 (2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザの現状と新型インフルエンザ対策 第 3 回東海北陸ブロック健康危機管理連絡協議会 名古屋、11 月 (2005)

小田切孝人 高病原性鳥インフルエンザと新型インフルエンザ対策 平成 17 年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所 2 月 (2006)

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2003-2004 年インフルエンザシーズンに流行した香港 (AH3) 型および B 型インフルエンザウイルスの  
ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性

分担研究者 西藤 岳彦  
農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所 感染症研究部  
協力研究者 国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室  
全国都道府県等地方衛生研究所  
World Health Organization Neuraminidase Inhibitors Sensitivity Network  
(WHO NISN)

**研究要旨** 2003/2004 年インフルエンザシーズンに分離された AH3 香港型中 1142 株のノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を検査したところ、3 株のノイラミニダーゼ阻害剤耐性株が検出された。耐性株の出現頻度と薬剤使用量の関連を検討するため、継続的な耐性株の監視システムの運用の必要性が示唆された。

## A. 研究目的

新型インフルエンザ出現時に十分量のワクチンが供給可能となるまでの期間にウイルスの感染拡大やそれに伴う健康被害を低減させ、社会的混乱を最小限にとどめるための対策として抗ウイルス剤による発症阻止、伝播の軽減が考えられている。しかし、抗ウイルス剤の一過性の大量使用によって薬剤耐性株が出現し、その後の感染制御を困難にさせる危険性を含んでいる。抗インフルエンザ剤のひとつであるアマンタジンやその誘導体でありリマンタジンは、高率に耐性株を選択することが知られている。一方、ノイラミニダーゼ阻害剤による耐性株の出現頻度は、アマンタジンに比べ大変低いと考えられていた。しかし、最近の Kiso らの報告 (Lancet 2004, 364 759-765) によると、乳幼児においては従来考えられていたよりも高率にノイラミニダーゼ阻害剤耐性株が出現する可能性が指摘されており、これは免疫学的にナイーブな宿主ではノイラミニダーゼ阻害剤

に対する耐性株がより出現しやすいという可能性を示唆している。このことは、パンデミック時において全人口が新型ウイルスに対して免疫的にナイーブな状況と類似しており、新型ウイルス出現時の大量の抗ウイルス剤の使用による耐性株の出現の可能性が危惧されている。このため、パンデミック初期の一時的なノイラミニダーゼ阻害剤の大量使用に際して、嚴重な抗ウイルス剤耐性の監視システムの必要性が唱えられている。

抗ウイルス剤耐性の監視には、平時における耐性ウイルス出現頻度のベースラインを把握しておくことは大変重要である。また、現在最も新型ウイルスとして警戒されているウイルスは、アジアからヨーロッパ、アフリカまでの広域に渡って家禽、野鳥で分離されている H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザであるが、その他の亜型のウイルスが新型ウイルスとなる可能性も否定できない。このため新型ウイルス対策としてノイラミニダーゼ阻害剤の使用を

考えるとき 9 亜型あるノイラミニダーゼの亜型毎のノイラミニダーゼの感受性域を把握しておくことは重要な課題である。

本年度の本研究においては、平時における耐性株の出現頻度を把握する目的で 2003-2004 年インフルエンザシーズンに流行した香港型 1,180 株および B 型インフルエンザウイルス 171 株についてノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を調べた。

## B. 研究方法

全国地方衛生研究所で 2003-2004 年インフルエンザシーズンに分離され、国立感染症研究所に分与された香港型 1,142 株および B 型インフルエンザウイルス 171 株を被検ウイルスとして使用。

World Health Organization Neuraminidase Inhibitors Sensitivity Network 検査協力機関である米国 ViroMed 社に被検ウイルスを送付、ロシュ社ノイラミニダーゼ阻害剤タミフルの活性型原末（カルボン酸オセルタミビアー）による 50%ノイラミニダーゼ酵素活性阻害濃度（IC50）を、NA-star（Tropix 社）を酵素基質として用いた化学発光法によって算出した。

IC50 の値の 25-75%が存在する幅を interquartile range (IQR)と呼び、その上限および下限から 3IQR 以上異なる値を示したものを限外値と呼び、そのような値を示したウイルスについてはノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸配列の推定を行った。

## C. 研究結果

検査した香港型 1,142 株および B 型インフルエンザウイルス 171 株は、全国ほぼ均等に分布しており、その 95%は当該インフルエンザシーズンの極期である 2004 年 1 月から 3 月に採取された（図 1）。

香港型、B 型についてのそれぞれの IC50 の中間値は、0.81 および 12.4 nM であり、極限外値を示したウイルスは香港型 3 株にとどまった。

図 1

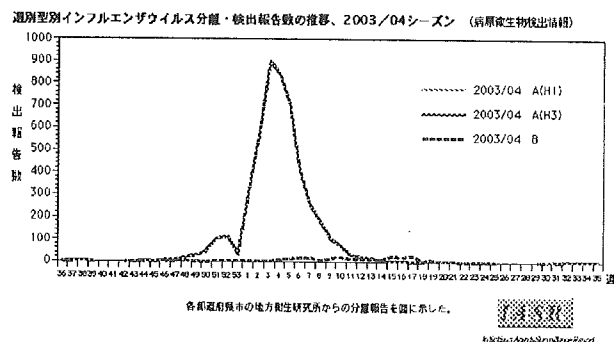


表 1: NA の型・亜型別 IC50.

Type/subtype	Date	2003-2004
N2	<i>N</i>	1142
	<i>Median</i>	0.81
	<i>UQ</i>	1.22
	<i>LQ</i>	0.56
	<i>Max</i>	9611.22
	<i>Min</i>	0.07
	<i>Extreme</i>	3
	<i>Mild</i>	12(0)
B	<i>N</i>	171
	<i>Median</i>	12.4
	<i>UQ</i>	18.32
	<i>LQ</i>	10.04
	<i>Max</i>	60.66
	<i>Min</i>	1.98
	<i>Extreme</i>	0
	<i>Mild</i>	8(0)

*N*: サンプル数

*Median*: IC50 中間値

*UQ*: IC50 の上限 3/4 値

*LQ*: IC50 の下限 1/4 値

*Extreme*: 極限外値（中間値の 10 倍以上の IC50 を示す株数）

*Mild*: 弱限外値（UQ 以上 10xIC50 以下の値を示す株数）

シーケンス解析に基づくアミノ酸推定の結果、限外値を示した 3 株すべてに既知のノイラミニダーゼ阻害剤耐性を担うとされるアミノ酸置換が認められた。一株においては、活性部位における変異である R292K、残りの二株では構造形成部位における変異である E119V が認められた。

耐性を示す変異を持った株の分離された患者は、



ノイラミニダーゼ阻害剤の投与を受けていないか、少なくとも投与以前であることがわかっているため、今回認められた変異が、自然獲得変異であるか市中に存在する変異株に感染したもののいずれであるが、詳細な感染経路は不明である。

#### D. 考察

2003/2004 年インフルエンザシーズンに分離された AH3 香港型中 1, 142 株に関するノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を検査したところ 3 株のノイラミニダーゼ阻害剤耐性株が検出された。これら 3 株はそれぞれ地理的に離れた地域から分離されていること、2 種類の異なった変異によって耐性を獲得していることから、薬剤耐性を獲得したウイルスが市中で伝播、拡散したとは考えづらい。

一方でわが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤の使用数は、2001 年のタミフル、オセルタミビアーの販売認可依頼激増の一途をたどっており、世界各国の中でも最も薬剤耐性株の出現の素地のそろった国となっている。今回得られた耐性株の出現にこのような薬剤の大量使用が関与しているかどうかは統計学的検討も含めて詳細の検討が必要であろう。

ノイラミニダーゼの抗原型による薬剤感受性の違いが存在する可能性が考えられた。すなわち、N2 型ノイラミニダーゼのオセルタミビアーに対する IC50 の中間値は 0.81nM であったのに対して、B 型ノイラミニダーゼのそれはおよそ 15 倍の 12.4nM であった。今回の検索では、検体の数が 7 倍以上違うため、母集団の違いによる影響も考慮する必要がある。今後の解析データの蓄積によって、異なった亜型、型間での感受性の差の有無を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

ノイラミニダーゼ耐性株が市中分離株から検出された。耐性株の出現頻度と薬剤使用量の関連を検

討するため、継続的な耐性株の監視システムの運用が必要であろう。

#### F. 健康危機情報

特記事項無し。

#### G. 研究発表

なし

EPIDEMIC  
ALERT &  
RESPONSE

## WHO の世界インフルエンザ事前対策計画

WHO の役割と前パンデミック期とパンデミック期における  
国家レベルの対策への提言

WHO/CDS/CSR/GIP/2005.5

Department of Communicable Disease  
Surveillance and Response  
Global Influenza Programme

(訳・監修：感染症情報センター第一室)

© World Health Organization 2005

All rights reserved.

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either express or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

Designed by minimum graphics

Printed in Switzerland

## 目次

要旨	4
1. はじめに	8
2. 新パンデミックフェーズの概要	11
3. 各フェーズごとの包括的目標, 目的, 対応	17
別添 1 医薬品以外の公衆衛生学的介入に関する提言	66
別添 2 参加者一覧	75
参考文献一覧	77

## 謝辞

WHOは、2004年12月開催に開催した、前パンデミック期とパンデミック期における国家および国際レベルのWHOが推奨する対策に関する専門家会議への参加者すべてに謝意を表す。彼らの作業がこの文書の基盤となった。特に、議長および報告者の皆様に対し、会議中および会議後の協力を感謝する。本会議は、感染症サーベイランスおよび対応部門 (Department of Communicable Disease Surveillance and Respons) のスタッフの支援を得て、WHO世界インフルエンザプログラム (WHO Global Influenza Programme) のチームが開催した。David Bell, Marja Esveld, Brian Wertschnig は、本文書作成に着手し、調整作業を行い、Jonathan Van Tamの助力を得て最終稿を完成した。また、本会議は、オーストラリア、ドイツ、オランダ、米国の各国政府の経済的支援により開催が可能となった。専門家会議参加者の一覧は別添2に示した。