

2007 26001A

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人

平成20年(2008)3月

目次

平成 19 年度

I 総括研究報告書

- 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 _____ P. 1
主任研究者：田代真人

II 分担研究報告書

1. 鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構 _____ P. 9
分担研究者：喜田宏
2. 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 _____ P. 12
分担研究者：河岡義裕
3. マスクの咳風速減弱効果に関する研究 _____ P. 14
分担研究者：岡部信彦 研究協力者：井上栄、小原弘道、杉原義文
4. ワクチン免疫原性強化技術の開発 _____ P. 20
分担研究者：高橋宜聖 研究協力者：阿戸学、小林和夫、小田切孝人、田代真人
5. 鳥類由来インフルエンザ A ウイルスのネコにおける感染機構の解析 _____ P. 28
分担研究者：山田章雄 協力研究者：棚林清、山本美江
6. H5N1 亜型インフルエンザウイルスを保有するオオクロバエを摂食したニワトリに対する経口感染の可能性について _____ P. 32
分担研究者：小林睦生 協力研究者：澤邊京子、星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、伊藤啓史、伊藤壽啓、二瓶直子、斉藤康秀、棚林清、堀田明豊、山田章雄
オオクロバエに対するオリセットネットの殺虫効果
分担研究者：小林睦生 協力研究者：富田隆史、葛西真治、駒形修
7. 新型インフルエンザウイルスの予防法・治療法の開発 _____ P. 44
分担研究者：長谷川秀樹 協力研究者：一戸猛志、佐田徹太郎
8. インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) 耐性株サーベイランス系の構築と耐性株の性状解析に関する研究 _____ P. 53
分担研究者：小田切孝人 協力研究者：氏家誠、小淵正次、影山努、島袋梢、望月菊、堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲、川上千春
9. ノイラミニダーゼ阻害剤投与を受けた患者から分離されたインフルエンザウイルスの阻害剤感受性試験 _____ P. 59
分担研究者：西藤岳彦 協力研究者：鈴木宏、齋藤玲子

10. 1. インフルエンザ大流行に対する非薬物的対策の評価 _____ P. 62
2. インフルエンザのウイルス学的検討
2-1 インフルエンザウイルスの抗原性および薬剤耐性に関する検討-日本、フィリピンの比較-
2-2 小児のインフルエンザにおける呼吸器および消化器からのインフルエンザウイルスの排泄
についての検討
分担研究者：押谷仁 協力研究者：鈴木陽、神垣太郎、齋藤麻理子、清水みどり、古瀬祐気、
藤直子

11. インフルエンザウイルス分離用宿主の検討に関する研究 _____ P. 77
分担研究者：滝澤剛則 協力研究者：中村一哉、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、倉田毅

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 19 年度総括報告書

主任研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部 部長

研究要旨 大きな健康被害と社会・経済的な影響を与える新型インフルエンザの出現が危惧されている。特に、2003 年暮れから東アジア地域における H5N1 型高病原性鳥インフルエンザの大流行は東南アジア、シベリア、インド、中東、ヨーロッパ、アフリカへ拡大し、61%という高い致死率を示す人感染例も出ている。このような高病原性ウイルスに由来する新型インフルエンザ大流行の場合には、未曾有の健康被害とそれによる社会・経済活動の麻痺・崩壊が生じることが懸念される。そこで、これに応じた事前準備と大流行時の緊急対応の具体的な行動計画を策定し、新型インフルエンザ健康危機管理体制を確立することが緊急課題となっている。本研究は、この事態に即応して、新型インフルエンザ大流行の際に、健康被害を最小限にとどめ、社会機能の維持を目的とした緊急対策・行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤を確立することを目的とした。

本年度は、(1) 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発、(2) 新型インフルエンザ出現の予想方法および早期検知する監視体制の確立、(3) 新型インフルエンザウイルス迅速診断キットの開発・改良 (4) 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・備蓄・接種方法の検討およびこれらの準備・実体制の確立、(5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立、(6) 感染病理機構の解明に基づく経鼻投与ワクチン、組織培養ワクチンの開発および新規弱毒生ワクチンの検討、(7) 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応に関する文献評価、(8) 諸外国の新型インフルエンザ対策計画の比較検討と国際協力の推進、(9) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立、について検討を加え、国レベル、地方レベル、国際レベルにおいて、わが国が緊急に行うべき具体的な行動計画をまとめ、またその実施のための科学的基盤と応用技術を確立することを目的として研究を進めた。

今年度の研究成果は直ちに厚労省の新型インフルエンザ対策ガイドラインの実施およびその改定に適用され、さらに WHO による諸ガイドラインのとりまとめにも応用された。一方、ワクチン緊急開発の成果は備蓄ワクチンの作製に応用された。これらの結果、わが国における新型インフルエンザ対策準備は、特に公衆衛生面において従来に比較して格段に進展したと評価できるが、更に社会危機への準備対応が必要である。

分担研究者

喜田 宏 北海道大学大学院
河岡義裕 東京大学医科学研究所
岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター
高橋宜聖 国立感染症研究所免疫部
山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部
小林睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部
長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部
小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部
西藤岳彦 (独行法)動物衛生研究所
押谷 仁 東北大学大学院
滝澤剛則 富山県衛生研究所

性は無く、何時でも人の世界に新型インフルエンザとして侵入して大流行を起こすことが危惧されている。高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の流行拡大にともなって、偶発的な人の感染例も増加しており、特に現在の H5N1 型ウイルスは宿主域が広く病原性が昂進してきているため、人においても 61%という高い致死率を示す重症疾患となっている。さらに、ウイルスの遺伝子変異が引き続き起こっており、人型のウイルスに近づきつつあると考えられている。

このような高病原性ウイルスに由来する新型インフルエンザ大流行の場合には、無差別多数の患者、死亡者の発生によって未曾有の健康被害が生じることが危惧される。特に、最も感染リスクの高い医療関係者にも多くの健康被害が生じて医療サービスの低下などの健康危機が起こることが憂慮される。さらに、これらに起因する交通・物流サービスの低下による食糧やエネルギー

A. 研究目的

2003 年後半以来、東アジア地域で発生した H5N1 型高病原性鳥インフルエンザの大流行は東南アジア、シベリア、インド、中東、ヨーロッパ、アフリカへ拡大しているが、依然制圧される可能

供給、一般的な社会サービスなどの社会・経済機能や治安体制の麻痺、破綻、更には社会危機が生じることが懸念されている。

新型インフルエンザ大流行における健康被害を最小限に留め、社会経済機能を維持することは、行政に課せられた大きな責任である。この責任を果たし、社会の要請に応えるためには、予め新型インフルエンザ大流行に対する危機管理計画を作成し、これを実施しておくことが必要である。

厚生労働省では、平成17年11月に新型インフルエンザ対策行動計画を発表したが、それに応じた事前準備と大流行時の緊急対応の具体的な行動計画を策定し、新型インフルエンザ健康危機管理体制を確立することが緊急課題である。新型インフルエンザの出現と大流行が危惧されている。その際には未曾有の健康被害と社会機能の麻痺・崩壊が予想される。新型インフルエンザ大流行に備えて、健康被害を最小限にとどめ、社会機能の維持を目的として、事前準備と緊急対策の行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤を確立・提供し、危機管理体制の確立に寄与することを目的とした。

具体的には、以下の項目について、分担研究者間で協力しながら並行して研究を進めた。

- (1) 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発
- (2) 新型インフルエンザ出現の予想方法および早期検知する監視体制の確立
- (3) 新型インフルエンザウイルス迅速診断キットの開発・改良・
- (4) 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立、およびプレパンデミックワクチンの製造、備蓄、接種方法および品質管理方法の確立
- (5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立
- (6) 感染病理機構の解明に基づく経鼻投与ワクチン、組織培養ワクチンおよび新規弱毒生ワクチンの開発
- (7) 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応に関する文献評価
- (8) 諸外国の新型インフルエンザ計画との比較と情報交換および協調体制の推進
- (9) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立、

B. 研究方法

1) 新型インフルエンザ出現機序の解明

a) 人獣共通感染症としてインフルエンザが宿主域種を越える要因と感染伝播機構を検討し、解明した。即ち、鳥からブタ、鳥からヒト、ブタからヒト、ヒトからヒトについて、それぞれのウイルス伝播機構と、その違いに関わる宿主因子を検討し

た。

また、ウイルスで汚染された鶏糞など摂食したハエなどの昆虫が、どの程度の期間にわたって感染力ウイルスを保持するのか、またニワトリがこれらの昆虫を捕食して感染を受けるのか否かを、動物感染実験において検討した。

一方、殺虫剤含有防虫ネットのハエに対する殺効果を調べ、養鶏場等における防護方への応用を検討した。b) ウイルス糖タンパク側のレセプター結合特性と宿主細胞側のウイルスレセプターの結合を分子レベル、電子レベルで解析し、宿主域を超えるレセプター要因を検討した。

c) ウイルス RNA ポリメラーゼ活性発現を促進又は抑制する宿主因子の違いを、鳥、ブタ、ヒトについて解析し、種特異性を規定する宿主要因を検討した。

d) 一方、水禽類が保有する低病原性鳥インフルエンザウイルスが直接・間接的に人に馴化して、人一人感染能力を獲得する分子機構およびそれを許容する条件を検討した。自然界の鳥ウイルスおよびヒトウイルスの分子疫学的調査と、鳥ウイルスとヒト細胞馴化ウイルス、ヒト分離ウイルスの比較および感染実験による感染標的と病原性の違いを検討した。

e) 日本およびモンゴルで分離された H5N1 ウイルスについて、ブタへの感染性の違いとその分子基盤を検討した。

2) 新型インフルエンザ出現予測方法の検討

1) の結果に基づいて、種を超える要因に対する監視方法論を確立し、鳥ウイルスの動向調査を行うことにより、新型ウイルス出現の可能性とその性状推定方法を検討し、新型インフルエンザ出現予測を検討した。

3) 新型インフルエンザ出現・流行動向監視体制の確立

現行の病原体サーベイランスおよび疾患サーベイランス体制を拡充し、必要な試薬、標準品、抗体、プライマーなどの事前作製により、新型ウイルスの早期検知と同定、流行動向に対する調査・監視体制の確立を目指した。

4) 新型インフルエンザ迅速診断キットの開発

先に SARS 迅速診断用に開発した遺伝子増幅検査法である LAMP 法を全ての亜型のインフルエンザウイルスに応用して、特別な高額機器を必要とせず、迅速、簡便、安価で、感度と特異性の高い診断キットを開発・実用化した。これを地方衛生研究所、検疫所、医療機関等に配布し、新型インフルエンザの早期検知とモニター、診断体制の整備を検討した。

さらに、最新の遺伝子塩基配列情報に基づいて、同キットおよび RT-PCR のプライマー、プローブの更新を検討した。

5) 新型ウイルスの性状解析と緊急ワクチン開発方

法の確立および製造・供給・接種体制及び効果・副作用のモニター体制の整備、ならびにプレパンデミックワクチンの備蓄と使用方法の検討

新型候補ウイルスおよび新型ウイルスについて、抗原性、抗原エпитープ、遺伝子塩基配列、糖鎖構造を詳細に検討した。

リバーシ・ジェネティクスを駆使して、HA と NA 遺伝子は新型ウイルス由来で、他の遺伝子は安全・高増殖性が確認されているワクチン製造用ウイルス株由来の弱度ウイルスを作製する技術を確認した。この際に、病原性を規定する遺伝子部位に変異を加えて、弱毒化した。これによって、任意のウイルス製造株の作製が1週間程度で可能となる体制を完成させた。

一方、このワクチン株を用いて、迅速に安全性と免疫原性を検証する試験方法を開発し、新型ワクチンの品質管理に応用できる迅速体制を検討した。

さらに、ワクチンの大量製造、効率の良い配布供給体制と集団接種等のワクチン接種体制のあり方を検討した。

また、プレパンデミックワクチンの備蓄に関して、製造株の選定、国家検定を含む品質管理方法の確立、事前接種の可能性の検討、緊急時への対応を検討した。そのために、国家備蓄ワクチンの一部についてアジュバントを添加した最終製品を試作し、これについて品質管理を行った。

6) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立、

新型ウイルスにおいても、薬剤耐性ウイルスが出現することが予想されるので、薬剤耐性ウイルスを能率よく検出できる方法を検討し、国内外におけるこのモニター体制の確立を進めた。

7) 鳥インフルエンザウイルスおよび新型ウイルスのヒトに対する感染病理機構の解明
ヒトに対する鳥インフルエンザウイルス感染の発症病理機構の実態を検討した。特に小児・若年者に健康被害が多い理由を検討した。

検討項目は、ウイルス感染とサイトカイン・ケモカイン誘導の分子機構、病原性発現とそれに関与する宿主因子の同定および宿主応答の実態、ウイルス病原性の分子基盤、宿主の免疫応答と感染防御免疫などについて解析する。これには、タイ、ベトナムの現地機関との共同研究により、患者材料と剖検材料の提供を受けて、免疫病理、免疫電顕、サイトカインやケモカインの発現量を検討した。

8) 次世代の新型インフルエンザワクチンの開発研究

従来の概念にとらわれず新しい発想で、有効かつ安全なインフルエンザワクチンの開発を進め、新型ワクチンにも即応できるように基盤整備を行った。

6)の結果に基づいて、より効果の高いワクチンの開発設計を行った。全粒子不活化ワクチンの経鼻投与により、広い範囲に交叉する局所粘膜免疫を誘導する新しい粘膜アジュバントを用いた経鼻接種ワクチンの基礎研究を動物レベル(マウスおよびカニクイザル)で検討した。一方、現行ワクチンの免疫原性を高めるためのアジュバントの開発研究を行った。様々な候補アジュバントについて、新型インフルエンザウイルスの抗原性、免疫原性を高めるものをスクリーニングし、安全かつ効果の高いものを選択した。次に、これを添加したワクチンを試作し、動物レベルで安全性と有効性を検証した。

この結果、一部にミスマッチをもつ2重鎖RNA (Ampligen) を添加して経鼻接種すると、局所IgA抗体、血清IgG抗体、細胞性免疫が誘導された。さらに、接種ウイルスのみならず、抗原的にも大きく異なる別の亜型、別のクレードのウイルスにも、高い交差免疫が誘導できることが示された。

そこで、実用化を目指して、動物を用いた非臨床試験を企画した。

さらに、自然免疫に対するモジュレーターによる感染病態の改善を図る新規治療薬の設計開発を行い、若年者における健康被害の制御法を検討した。

また、H5N1ウイルスの病原性に強く関わるNA遺伝子について、これを一部欠失したウイルスを作出して、動物実験においてワクチンの可能性を検討した。

9) 抗ウイルス剤の備蓄および使用方法の確立及び効果・副作用・耐性ウイルスのモニター体制の整備

ノイラミニダーゼ阻害剤とアマンタジンについて、耐性ウイルスの出現機構を分子レベルで解明した。これに基づいて、耐性ウイルスのモニター方法を確立し、体系的かつ効率のよいモニター体制のあり方を検討した。また、WHO が主催する耐性ウイルスモニターネットワークに参加し、薬剤耐性、遺伝子変異部位の同定を比較検討して、適切な使用に関する勧告案を作成した。

9) 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応のあり方の検討

新型インフルエンザ出現の時間系列に従って、隔離、検疫等の介入手段の効果を評価し、プライバシーや人権確保とのバランスを検討した。

公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応に関する文献評価を行った。世界各国の新型インフルエンザ計画およびこれまで公表された多くの論文についてメタアナリシスを行い、各対策における有効性、実施可能性、社会的影響等について評価を行った。

これらの結果をもとに、多数の患者が出現する

事態における社会危機管理のあり方と緊急対応の具体的項目を提起した。

9) 諸外国の新型インフルエンザ対策計画の比較検討と国際協力の推進

新型インフルエンザ対策の実施において、諸外国との協調が不可欠であることから、各国の新型インフルエンザ計画を翻訳して各方面に配布し、我が国の対策計画、ガイドラインとの比較検討を行った。また、我が国のガイドラインを英訳し、これを諸外国の関係機関に必要に応じて配布した。諸外国の新型インフルエンザ対策計画の比較検討と国際協力の推

10) 机上演習の企画と実施

新型インフルエンザに対する危機対応行動計画案に基づいて、様々な業種を対象とした様々なシナリオにおける机上演習を企画、実施し、問題点の抽出と、各職種・各人のとるべき判断、行動についての訓練を実施した。

11) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立、

新型ウイルスにおいても、薬剤耐性ウイルスが出現することが予想されるので、薬剤耐性ウイルスを能率よく検出できる方法を検討し、国内外におけるこのモニター体制の確立を進めた。

C. 結果

(1) 鳥ウイルスのヒト型への変身要因として、HA 蛋白レセプター認識部位の変異と RNA ポリメラーゼ変異による低温の増殖性が示された。これら遺伝子の解析から、H5N1 型はヒト型へ近づきつつあることが示唆された。

またクロバエとネコについて、捕食と飛翔行動からクロバエ類がウイルス拡散に果たす役割と、ネコ体内では効率よく H5N1 ウイルスが増殖してウイルス感染伝播に関与する可能性が示された。

一方、国内外の鳥、ブタにおけるインフルエンザを検討し、OIE, WHO と協力して国際監視体制の確立を進めた。

(2) インフルエンザ流行期におけるウイルス学的・疫学的な詳細な解析を行って、欠落している必要情報を集積し、新型インフルエンザ出現予測の感度と特異性を検討した。また H5N1 感染症例、予想される新型インフルエンザの症例検討から、症例定義、診断検査方針を検討し、新型インフルエンザ対策計画および対策ガイドラインを改定した。

(3) 流行中の鳥ならびに人ウイルスの全てを検出できる RT-PCR プライマーを設計・改良し、WHO 標準プライマーとして公表した。また、簡易迅速診断キットとして LAMP 法を開発し、国内で市販される見通しとなった。

(4) 2004 年ベトナム分離株に基づき、リバーズジェティクスを用いて弱毒ワクチン製造候補ウイ

ルスを作成した。アルミアジュバント添加全粒子不活化ワクチンを作製し、非臨床試験、第 1 相臨床試験を行った結果、免疫原性、安全性には問題はなく、ウイルス抗原の節約が可能であった。第 2+3 相試験を実施し、製造承認を申請し、取得した。この成果は WHO 会議でも高く評価され、他国でも同方式による新型ワクチン開発を進めている。

さらに 2005 年インドネシア分離株由来の備蓄用ワクチン(1 千万人分)の製造への応用に引き続き、2007 年には安徽株ワクチンの備蓄が行われた。

また、ベトナム株で免疫されたヒトの血清について、他のクレードのウイルスに対する中和抗体価を測定したところ、強い交差反応性が認められた。

(5) NISN に参画し、2001 年以來の流行ウイルスの薬剤感受性と遺伝子変異を調べた結果、現時点での耐性ウイルスは 1% 未満であったが、治療後に薬剤耐性が出現する可能性が示唆された。また H5N1 ウイルスに対しては、治療にはタミフル通常量の 2 倍量で 10 日間投与する必要が示唆された。

(6) 高病原性 H5N1 ウイルスの人感染では、ウイルスは全身臓器へ感染が拡がり、HA の解裂部位がこれを規定していた。また NS1 と PB2 遺伝子がサイトカインストームと多臓器不全をもたらすことが分かった。一方、H5N1 型不活化全粒子ワクチンの中和抗体誘導能は低いが、マウスに感染防御効果を付与でき、この感染防御因子は抗体であった。これらに基づき、TLR9 を標的とした 2 重鎖 RNA 添加経鼻ワクチンを開発し、サル実験で有効性と広い交叉免疫誘導を確認した。また組織培養ワクチン開発を進め、MDCK 細胞高増殖性の NA 欠損 A/VietNam/1194/2004 株を作成した。

(7) 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応について、国レベル、地方レベル、国際レベルにおいて、わが国が緊急に行うべき具体的な行動計画をまとめ、またその実施のための科学的基盤と応用技術を検討した。

分担研究者の研究成果

喜田宏

鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染被害はアジアからヨーロッパ、アフリカ諸国にまで拡大している。このウイルスによるヒトの感染・死亡例も報告され、ヒトからヒトへの伝播能を獲得すれば、新型ウイルスとしてパンデミックを起こすことが危惧されている。鳥インフルエンザのサーベイランスによって、そ

の制圧のための疫学情報のみならず、ヒトの新型コロナウイルスの出現予測のためにも有益な情報が得られる。

本研究は、鳥インフルエンザの疫学情報を継続的に収集するためにグローバルサーベイランスを実施するとともに、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への感染機構を明らかにすることを目的とした。

本年度は、日本、モンゴルにおいて採取された渡りガモおよびハクチョウの糞便材料1,692検体から合計36株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらの分離株には強毒のH5やH7亜型ウイルスは含まれていなかった。

2005年、オオハクチョウの斃死体から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスA/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1) [以下、モンゴル/05 (H5N1)株]は豚に感染し、2004年に山口県のニワトリから分離されたA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)は豚に感染しないことを実験感染により確認した。これらのウイルスの遺伝子の比較解析から、モンゴル/05 (H5N1)株の豚での増殖性には、NP、M、NSの3つの遺伝子が関与していることが明らかになった。これは、HAやNAの亜型に関係なく、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物に感染する可能性があることを示している。

河岡義裕

NA蛋白質を欠損したインフルエンザウイルスは、マウスモデルで病原性が低いことがわかっている。しかし、MDCK細胞での増殖性も低かった。

そこで、平成18年度に作出した、MDCK細胞で効率よく増殖するNA欠損ウイルス(VN1194HAAvrNA-株)を用いて、本年度は、マウスにおける病原性を解析した。

VN1194HAAvrNA-株は、マウスに対して弱毒であり、高病原性H5N1インフルエンザウイルスの攻撃を防御した。したがって、ワクチンとして有用であると考えられる。

岡部信彦

マスクの咳風速減弱効果に関する研究

新型インフルエンザ発生への対策の一つとして、一般集団内の咳患者へマスクを配布して流行を遅らせ、流行を穏やかなものにさせることが考えられる。

平成17年度の我々の研究では、咳の風速を超音波風速計で測定し、マスクによって咳風速が1/10以下になることを明らかにした。

平成18年度の研究では、グリセリン・ミスト

を充填させたチャンバーに咳風を吹き込み、ミストの動きを粒子画像流速計測法で解析した。マスクを使うと、ミストの速度と流動範囲とが大幅に抑制されることがわかった。

今年度は、超音波風速計の代わりに超微差圧計を用いて、口直前での咳風の風圧を測定した。9種類の安価な市販マスク(10~70円)を使い、風圧が抑制されるかを調べると、超音波風速計での結果と同様であった。つまり、マスクの咳風への抑制効果を異なる3種類の方法で調べても、あらゆるマスクは咳の風圧を顕著に低下させることがわかった。咳をする患者がマスクを使えば、インフルエンザウイルスの広がりを効果的に抑制することが期待できる。

高橋宜聖

ワクチン免疫原性強化技術の開発

新型インフルエンザ用ワクチン(NIBRG-14)を接種したマウスでは、血清抗ヘマグルチニン(HA)抗体、あるいは抗ノイラミニダーゼ(NA)抗体が主要な感染防御因子であることを昨年度までに明らかにした。

本年度の研究では、抗HA抗体と抗NA抗体の感染防御能を比較するため、NIBRG-14ワクチンの抗血清から抗HA/NA抗体を除去した後、先天的リンパ球欠損(scid)マウスに移入した。すると、非除去血清に比べて、抗HA抗体を除去した血清と抗NA抗体を除去した血清の双方で強毒H5N1株の攻撃実験に対する感染防御能の低下が観察されたことから、NIBRG-14ワクチンが惹起する感染防御効果は、抗HA抗体と抗NA抗体の両者に依存する可能性が示唆された。

山田章雄

鳥類由来インフルエンザAウイルスのネコにおける感染機構の解析

ネコでの高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染機構を明らかにすることを目的に、H5N1亜型の弱毒及び強毒株ウイルスのネコ由来培養細胞及びMDCK細胞やその他の動物由来培養細胞での増殖性を調べた。

いずれのウイルス株もネコ由来培養細胞CRFK、Fc3Tg、FCWF-4、AK-Dやミンク由来細胞でMDCK細胞と同等またはそれ以上に増殖したがウサギやマウス由来細胞では増殖が低かった。鳥類由来ウイルスがネコにも感染し増殖する要因の一つであることを示しているが、各細胞の受容体やウイルス複製における因子等の更なる解析が必要である。

小林睦生

1) オオクロバエに対するオリセットネットの殺虫効果

オオクロバエは、冬季にわが国の畜舎に侵入するハエ類の中でもっとも主要な種である。オリセットネットは、ピレスロイド系殺虫成分のペルメトリンをその繊維の中に含む蚊帳の一つで、海外のマラリア流行地域でマラリア感染を防ぐために開発されたものである。オリセットネットの畜舎への設置がオオクロバエの防除に有効であるかを検討するために、オリセットネット接触がもたらす致死効果を試験した。

麻酔なしオオクロバエ成虫を一定時間オリセットネットに接触させ 24 時間後の生存を観察する限定時間接触法により、接触による半数致死時間は、雌では約 30 秒、雄では 30 秒以内と推定し、基礎試験としてのオリセットネットの有効性が示された。

2) H5N1 亜型インフルエンザウイルスを保有するオオクロバエを摂食したニワトリに対する

経口感染の可能性について

ウイルス保有オオクロバエの摂食によるニワトリ経口感染の可能性を検討するために、まず H5N1 亜型ウイルス強毒株を用いてウイルス保有クロバエを作成し、ハエ体内でのウイルスの生存を弱毒株での結果と比較した。その結果、強毒株のウイルス力価はオオクロバエが摂食した後 48 時間まで維持されることが判明した ($10^{1.8-2.8}$ EID₅₀/0.1ml)。前回の弱毒株に対する摂食実験では、その判定に MDCK 細胞への接種法を用いたが、今回の強毒株摂食実験では、発育鶏卵接種系により行った。

一般に、鶏卵接種法が MDCK 接種法に比べ 10 倍検出感度が高いといわれていることから、結果に 24 時間の差異が生じたと考えられる。したがって、本結果により、クロバエ体内でウイルスが生存する時間は 24~48 時間であると結論したい。

また、オオクロバエ 31 頭を約 6 週齢のニワトリが入ったケージに放したところ、7 分ですべてのハエが捕食されたことから、ニワトリは目前に止まったハエ類を好んで食べることが確認された。なお、ニワトリへのウイルス保有クロバエの摂食実験は現在調整中である。

長谷川秀樹

新型インフルエンザウイルスの予防法・治療法の開発

高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1) は本邦を含めたアジア諸国に広がり中東を経てヨーロッパ、アフリカまへの広がりを見せている。また、動物からヒトへの感染例も増え続けておりその致死率の高さからヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスへ発展したときの対応が急務である。本疾患のヒトでの感染の防御には効果的なワクチンの開発が急務である。

本研究においては交叉防御能のある粘膜投与型インフルエンザワクチンの開発をおこないそのメカニズムの解明を行った。

Natural Killer T 細胞を活性化することにより経鼻粘膜ワクチンの効果を強め、皮下接種と比較する事により粘膜ワクチンの利点を証明した。

粘膜ワクチンはその感染防御能と交叉防御能に優れており新型インフルエンザの流行の防御の為に欠かせない。その粘膜免疫誘導の新しいメカニズムとして、粘膜局所に関連したリンパ装置での CXCL16 と IL-4 の関与が明らかとなった。

小田切孝人

インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) 耐性株サーベイランス系の構築と耐性株の性状解析に関する研究

我が国では、2001 年にインフルエンザの治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬 (NAI) の zanamivir 及び oseltamivir が認可されたが、現在では全世界の生産量の 50~70% を使用している。NAI 使用量の増加に伴い耐性株の出現が懸念される中、2007 年 11 月以降から EU 諸国で高頻度 (20% 以上) に耐性株が分離され、世界的な流行の兆しを見せている。このため、全世界的な NAI 耐性株サーベイランスの強化と重要性が高まっており、我が国でも NAI 耐性株サーベイランスの整備と構築が急務となった。

本研究では、我が国の NAI 耐性株サーベイランス系の確立を目的に、市中分離株の薬剤感受性の測定と NA 遺伝子解析とを迅速に行う系を構築した。この系を用いて、2007/2008 シーズンの市中分離株に対する性状解析を行った。

西藤岳彦

ノイラミニダーゼ阻害剤投与を受けた患者から分離されたインフルエンザウイルスの阻害剤感受性試験

ノイラミニダーゼ阻害剤による生体内での抵抗性株の出現の可能性を検討するため、2006/07 インフルエンザシーズンにノイラミニダーゼ阻害剤によるインフルエンザ治療を受けた患者計 11 名の治療前後に分離されたウイルスについて、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を検討した。また、ノイラミニダーゼ阻害剤治療を受けた患者とその家族 (計 20 組) から分離されたウイルス 42 株に関しても同様の検討を行った。今回の解析では、ノイラミニダーゼ阻害剤治療による耐性の獲得は認められなかった。

押谷 仁

1) インフルエンザパンデミックに対する非薬物的対策の評価

、非薬物的対策がインフルエンザ対策として有効

であるか、Pubmed を用いた literature review を行った。

2-1) インフルエンザウイルスの抗原性および薬剤耐性に関する検討—日本、フィリピンの比較

フィリピンと日本におけるインフルエンザウイルスの抗原性の変異および薬剤耐性との関連について考察した。

2-2) 小児のインフルエンザにおける呼吸器および消化器からのインフルエンザウイルスの排泄についての検討

小児のインフルエンザ様症状を呈した患者の咽頭および便よりインフルエンザウイルスの検出を試みた。

滝澤剛則

インフルエンザウイルス分離用宿主の検討に関する研究

MDCK 細胞と、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞におけるインフルエンザウイルス (AH1、AH3) の感染様式を検討した。

AH1 ウイルスは、MDCK 細胞に効率よく感染するのに対して、Caco-2 細胞には MDCK 細胞に比して 10 分の 1 程度の感染能を示した (平成 18 年度報告書)。

一方、AH3 ウイルスは、Caco-2 細胞にも MDCK 細胞と同等以上に効率よく感染した。

Caco-2 細胞は高度に分化するとドームを形成するが、AH1 ウイルスがドームにほとんど感染しなかったのに対して、AH3 ウイルスはドームにも効率よく感染した。

レクチンによる $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$ 結合シアル酸の染色では、MDCK、Caco-2 細胞膜上のシアル酸の量に大きな差は認められず、特に、ドームは強く染色された。

以上から、腸管由来 Caco-2 細胞で AH1、AH3 の感染効率が異なるのは、ウイルス側に要因があることが推定された。

一方、ノイラミニダーゼ変異ウイルスを効率よく分離するために、ノイラミニダーゼを恒常的に、あるいは誘導可能な形で発現する MDCK 細胞の作製を試み、複数の細胞を得た。

D. 考察

本研究の結果、1) 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発、2) 新型インフルエンザ出現を検知する監視体制の確立、3) LAMP 法による新型インフルエンザ迅速診断キットの開発・改良・普及、4) 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立、5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立、6) 緊急医療サービス確保体制の確立、7) 感染病理機構の解明に基づく有効かつ安全な予防方法 (経鼻投与ワクチン開発) と治療方法の開発、8) 健康危

機管理、社会危機管理体制の整備が行われ、新型インフルエンザ大流行による健康被害の最小化と、社会・経済機能の崩壊を防止するための方策が提起された。

これらの結果は直ちに行政対応に応用され、昨年度では平成 16 年 11 月には厚生労働省が新型インフルエンザ対策行動計画を我が国のガイドラインとしてまとめたが、その後本研究の成果を中心として、平成 17 年 6 月には H5N1 感染症を指定感染症として予め指定し、更に 6 月にはフェイズ 3 までの新型インフルエンザ対策ガイドラインを策定し、平成 19 年 3 月にはフェイズ 4 以後ガイドラインを作成した。また、備蓄ワクチンの作製に応用された。今後は、これに基づいた具体的な施策を決めていくことになる。

次年度における本研究の目的は、このような事態の変化に対応して、新型インフルエンザ大流行に備えて、健康被害を最小限にとどめ、社会機能の維持を目的とした事前準備と緊急対策・行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤を確立することにある。

E. 結論

① 遺伝子解析から、H5N1 ウイルスはヒト型へ近づいている。クロバエとネコがウイルス伝播する可能性がある。② 新型インフルエンザ出現予測の感度と特異性を検討し、症例定義、診断検査ガイドラインをまとめた。③ 全 H5N1 ウイルスを検出する RT-PCR 標準プライマーを設計した。④ ベトナム株のワクチン株を作出し、アルミアジュバント添加全粒子不活化ワクチンの非臨床、第 1、2+3 相臨床試験を行ない、製造承認を申請した。備蓄ワクチン製造に用いた。⑤ 2001 年以来タミフル耐性株は 1% 未満である。⑥ 人の H5N1 感染は全身感染であり、サイトカインストームと多臓器不全をもたらす。2 重鎖 RNA 添加経鼻ワクチン、NA 欠損組織培養ワクチンを開発した。

現在の H5N1 型高病原性ウイルスは依然トリ型だが、一旦感染すると致死率 60% を超す重症疾患となる。徐々にヒト型への遺伝子変化が生じており、トリの間での流行が続けば、突然変異が蓄積し新型ウイルスへの変化が懸念される。その際、現在のトリ型ウイルスと同様に、インフルエンザとは異なる重症全身性疾患 (ウイルス全身感染と、サイトカインストームによる多臓器不全) をもたらす可能性があり、未曾有の健康被害が危惧される。健康危機管理、公衆衛生上の事前準備と緊急対応体制の整備と、社会危機管理体制の整備によって、新型インフルエンザ大流行による健康被害の最小化と、社会・経済機能の崩壊を防止することが必須である。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

Ninomiya, A., Imai, M., Tashiro, M., vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model Vaccine 25: 3554-3560, 2007
Odagiri, T.: Inactivated influenza H5N1 whole-virus

Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Nomoto, T., Ishizaki, T., Tu, P.-V., Tien, N. T. K., Tashiro, M., Odagiri, T.: Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method J. Virol. Methods 141: 173-180, 2007

Ichinohe, T., Nagata, N., Strong, P., Tamura, S., Takahashi, H., Ninomiya, A., Imai, M., Odagiri, T., Tashiro, M., Sawa, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. *
Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. J. Med. Virol. 79: 811-819, 2007

Ichinohe, T., Tamura, S., Kawaguchi, A., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, Takahashi, H., M., Sawa, S., Mitchell, W. H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. *
Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine J. Infect. Dis. 196:1313-1320, 2007

Tashiro, M., Monto, A. S., Macken, C., McKimm-Breschkin, J. L., Hampson, A. W., Hay, A., Klimov, A., Webster, R. G., Hayden, F. G., Zambon, M.: Monitoring of neuraminidase inhibitor resistance among clinical influenza viruses isolates in Japan during the 2003-2006 seasons. WHO Weekly Epidemiological Records 82: 149-150, 2007

Ichinohe, T., Kawaguchi, A., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. Microbe. Infect. 9: 1333-1340, 2007

Kamijuku H., Nagata, Y., Ichnose, T., Jiang X., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, Y., Hase, K., Ohno, H., Shimaoka, T., Tonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H., Seino, K. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide which can induce cross-protection against influenza viruses. Mucosal Immunol. (2008, in press)

Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A. M., Smith, D. J. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses Science (2008, in press)

Ogata, T., Yamazaki, Y., Okabe, N., Nakamura, Y., Tashiro, M., Nagata, N., Itamura, S., Yasui, Y., Nakashima, K., Doi, M., Izumi, Y., Fujieda, T., Yamato, S., Kawada, Y.: H5N2 influenza infection to human in Japan and association of seasonal influenza vaccination with positive H5N2 neutralizing antibody J. Epidemiol. (2008, in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	無
実用新案登録	無
その他	無

鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構

北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座 教授 喜田宏

研究要旨 H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染被害はアジアからヨーロッパ、アフリカ諸国にまで拡大している。このウイルスによるヒトの感染・死亡例も報告され、ヒトからヒトへの伝播能を獲得すれば、新型ウイルスとしてパンデミックを起こすことが危惧されている。鳥インフルエンザのサーベイランスによって、その制圧のための疫学情報のみならず、ヒトの新型ウイルスの出現予測のためにも有益な情報が得られる。本研究は、鳥インフルエンザの疫学情報を継続的に収集するためにグローバルサーベイランスを実施するとともに、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への感染機構を明らかにすることを目的とした。本年は、日本、モンゴルにおいて採取された渡りガモおよびハクチョウの糞便材料1,692検体から合計36株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらの分離株には強毒のH5やH7亜型ウイルスは含まれていなかった。2005年、オオハクチョウの斃死体から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスA/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1) [以下、モンゴル/05 (H5N1)株]は豚に感染し、2004年に山口県のニワトリから分離されたA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)は豚に感染しないことを実験感染により確認した。これらのウイルスの遺伝子の比較解析から、モンゴル/05 (H5N1)株の豚での増殖性には、NP、M、NSの3つの遺伝子が関与していることが明らかになった。これは、HAやNAの亜型に関係なく、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物に感染する可能性があることを示している。

A. 研究目的

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染被害はアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、中近東、ヨーロッパおよびアフリカ諸国に拡大している。このウイルスによるヒトの感染・死亡例も報告されており、新型インフルエンザウイルスとしてパンデミックを起こすことが危惧されている。ヒトを含む哺乳動物および鳥類のインフルエンザウイルス遺伝子の起源は、カモなどの野生水禽のウイルスにあることが今までの研究から明らかにされている。これらのことから、本研究は鳥インフルエンザのグローバルサーベイランスを継続して実施し、分離同定されたウイルス株の抗原性、遺伝子性状、病原性を明らかにすることを第1の目的とする。さらにこれらのウイルスのヒトへの感染機構を解明し、新型インフルエンザ対策に資することを第2の目的とする。

B. 研究方法

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からインフルエンザウイルスの分離を試みた。さらに分離されたウイルスのHAおよ

びNAの亜型を同定した。HAおよびNAの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、これらのウイルス株のHA遺伝子の塩基配列を決定し、HA開裂部位のアミノ酸配列を解析した。

2005年および2006年にモンゴルで野生水禽の斃死体から分離されたH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス [以下、モンゴル/05 (H5N1)株、モンゴル/06 (H5N1)株とする] をマウスおよび豚に接種し、哺乳動物における感受性と病原性を調べた。さらに、豚に感染するモンゴル/05 (H5N1)株と豚に感染しないA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) [以下、山口/04 (H5N1)株] の遺伝子を比較解析し、鳥インフルエンザウイルスの豚における増殖に与る分子機構の解明を目指した。

C. 研究結果

野生水禽の糞便1,692検体から36株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH1、H3、H4、H5、H7、H8、H10、H11、H12の9つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H3、N4、N5、N6、N7、N8の8

つの亜型に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りのうち、136通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。

豚に感染するH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス モンゴル/05 (H5N1)株と感染しない山口/04 (H5N1)株の遺伝子再集合ウイルスを、リバースジェネティクス法を用いて作出した。これらのウイルスをそれぞれ豚に経鼻接種し、鼻汁中からのウイルス回収とウイルス接種前後における抗体価の上昇を指標に、豚で増殖するウイルスとしないウイルスに区分した。その結果、鳥インフルエンザウイルスの豚における増殖性にはHAやNA遺伝子は関与せず、NP、M、NSの3つの遺伝子が関与していることが明らかになった。

D. 考察

モンゴル/05 (H5N1)株の豚における増殖性にはNP、M、NSの3つの遺伝子が関与していることが明らかになった。この成績は、HAやNAの亜型にかかわらず、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物に感染する可能性があることを示している。今後、モンゴル/05 (H5N1)株のNP、M、NSの3つの遺伝子が豚での増殖性に関与する分子メカニズムを解明する予定である。

E. 結論

動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスは、動物とヒトのインフルエンザ対策に有益な情報とウイルス株を提供する。また、分離されたウイルスを用いた研究の成果により、鳥インフルエンザウイルスの豚への感染機構が解明されつつある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujii, K., Kakumoto, C., Kobayashi, M., Saito, S., Kariya, T., Watanabe, Y., Sakoda, Y., Kida, H., and Suzuki, M. (2007). Serological evidence of influenza A virus infection in Kuril harbor seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 69, 259-263.
- (2) Guo, C. T., Takahashi, N., Yagi, H., Kato, K., Takahashi, T., Yi, S. Q., Chen, Y., Ito, T., Otsuki, K., Kida, H., Kawaoka, Y., Hidari, K. I., Miyamoto, D., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (2007). The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* 17, 713-724.
- (3) Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawaoka, Y., Ogasawara, K., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.
- (4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., and Kida, H. (2008). Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci.* in press
- (5) Ozaki, H., and Kida, H. (2007). Extensive accumulation of influenza virus NS1 protein in the nuclei causes effective viral growth in vero cells. *Microbiol Immunol* 51, 577-580.
- (6) Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tsuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokuai, N., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine.* in press
- (7) Shin, J. H., Sakoda, Y., Kim, J. H., Ochiai, K., and Umemura, T. (2007). C

- omparison of antibody titers in rabbits following immunization with inactivated influenza virus via subarachnoidal or subcutaneous route. *J Vet Med Sci* 69, 1167-1169.
- (8) Soda, K., Sakoda, Y., Isoda, N., Kajihara, M., Haraguchi, Y., Shibuya, H., Yoshida, H., Sasaki, T., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., and Kida, H. (2008). Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn J Vet Res* 55, 93-98
- (9) Takeda, S., Ozaki, H., Hattori, S., Ishii, A., Kida, H., and Mukasa, K. (2007). Detection of influenza virus hemagglutinin with randomly immobilized anti-hemagglutinin antibody on a carbon nanotube sensor. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 752-756.
- (10) Tsuda, Y., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., and Kida, H. (2007). Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 51, 903-907.
- N-linked glycosylation associated with antigenic changes of influenza virus hemagglutinin. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (4) Soda K, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, Minari K, Kida H: Does H9N2 avian influenza virus acquire high pathogenicity for chicken? Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (5) Sakoda Y, Isoda N, Soda K, Kishida N, Takada A, Sodnomdarjar R and Kida H: "Characterization of H5 avian influenza virus isolates in Asia", Toronto, Canada, Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

2. 学会発表

- (1) Isoda N, Soda K, Sakabe S, Kishida N, Sakoda Y, Kida H: Effect of inactivated avian influenza vaccine prepared from an apathogenic H5N1 reassortant virus generated between H5N2 and H7N1 isolates from migratory ducks in Asia on protection of chickens against challenge with highly pathogenic avian influenza virus strains. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (2) Kida H, Sakoda Y, Isoda N, Soda K, Kishida N: Library of influenza virus strains and genes for vaccine and diagnostic use as the preparedness for pandemics and Highly pathogenic avian influenza. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (3) Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A: Genetically destined potentials for

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

分担研究者 河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨: NA 蛋白質を欠損したインフルエンザウイルスは、マウスモデルで病原性が低いことがわかっている。しかし、MDCK 細胞での増殖性も低い。昨年度作出した、MDCK 細胞で効率よく増殖する NA 欠損ウイルス (VN1194HAAvrNA-株) を用いて、本年度はマウスにおける病原性を解析した。VN1194HAAvrNA-株は、マウスに対して弱毒であり、高病原性 H5N1 インフルエンザウイルスの攻撃を防御した。したがって、ワクチンとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザによるパンデミックの発生に備え、人体用の H5N1 不活化ワクチンの開発が臨床試験段階にまで進んでいる。しかし、発育鶏卵がワクチンの製造母体であるため、実際のパンデミック時にはワクチン生産性、供給性が減少する可能性が高い。そこで、MDCK 細胞を用いてワクチンを供給する系の開発を目的として、本研究を行った。

B. 研究方法

昨年度、MDCK 細胞で効率よく増殖する NA 欠損 A/VietNam/1194/2004 株 (VN1194HAAvrNA-株) を作出した。本年度は、ワクチン候補ウイルス株としての有効性を確認するため、マウスにおける病原性を解析した。

C. 研究結果

VN1194HAAvrNA-株 10^5 PFU をマウスに経鼻感染させたところ、マウスは全く症状を示さなかった。また、ウイルスは、感染したマウスの肺および鼻（および脳）から分離された。感染したマウスの肺洗浄液および血清中にはウイルスに対する高いタイトーの IgG 抗体が、また鼻洗浄液中には IgA 抗体が検出された。このウイルス株 10^5 PFU をマウスに経鼻感染させ、3 週間後に $100LD_{50}$ の高病原性 A/VietNam/1203/04、A/VietNam/1194/04、A/Indonesia/7/05 の各ウイルスで攻撃したところ、いずれの群のマウスも死ななかった。

このウイルス株の霊長類におけるワクチン効果の検討を計画している。攻撃に用いるウイルスの選定を行うために、近年ヒトから分離された H5N1 ウイルスを用いて、カニクイザルでの病原性を検討した。

D. 考察

VN1194HAAvrNA-株は、マウスに対して弱毒であり、高病原性 H5N1 インフルエンザウイルスの攻撃を防御した。したがって、ワクチンとして有用であると考えられる。ただし、感染させたマウスの脳内からウイルスが分離されたため、安全性の点から、この問題を克服する必要がある。

E. 結論

本研究で作製した NA 欠損ウイルスは、今後のワクチン開発に役立つと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* 81:30-41, 2007.

Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, Kawakami C, Kiso M, Ito M, Hatakeyama S, Kawaoka Y. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis* 44:197-202, 2007.

Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, Kiso M, Shimizu H, Kawakami C, Koike K, Mitamura K, Kawaoka Y. Emergence of Influenza B Viruses with Reduced Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. *JAMA* 297, 1435-1442, 2007.

Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Kino Y, Kawaoka Y. Enhanced growth of seed viruses

for H5N1 influenza vaccines. *Virology* 366:23-27, 2007.

Ozawa M, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. An Adenoviral Vector-Mediated Reverse Genetics System for Influenza A Virus Generation. *J Virol* 81:9556-9559, 2007.

Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Kawaoka Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice *PLoS Patho* 3:1374-1379, 2007.

Rigoni M, Shinya K, Toffan A, Milani A, Bettini F, Kawaoka Y, Cattoli G, Capua I. Pneumo- and eurotropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. *Virology* 364, 28-35, 2007.

Guo CT, Takahashi N, Yagi H, Kato K, Takahashi T, Yi SQ, Chen Y, Ito T, Otsuki K, Kida H, Kawaoka Y, Hidari KI, Miyamoto D, Suzuki T, Suzuki Y. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* 17, 713-724, 2007.

Sawada T, Hashimoto T, Nakano H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y, Ishida H, Kiso M. Influenza viral hemagglutinin complicated shape is advantageous to its binding affinity for sialosaccharide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 355:6-9, 2007.

250. Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *J Gen Virol* 88, 547-532, 2007.

Zhu Q, Yang H, Deng G, Yu K, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol* 82:220-228, 2008.

Jiao P, Tian G, Li Y, Liu C, Liu W, Deng G, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A single amino acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol* (in press).

2. 学会発表

なし

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

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

マスクの咳風速減弱効果に関する研究（平成 19 年度）

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長
研究協力者	井上 栄	大妻女子大学家政学部教授
	小原弘道	首都大学東京大学院理工学研究科助教
	杉原義文	(株) 日建設計総合研究所主任研究員

研究要旨 新型インフルエンザ発生への対策の一つとして、一般集団内の咳患者へマスクを配布して流行を遅らせ、流行を穏やかなものにさせることが考えられる。平成 17 年度の我々の研究では、咳の風速を超音波風速計で測定し、マスクによって咳風速が 1/10 以下になることを明らかにした。平成 18 年度の研究では、グリセリン・ミストを充満させたチャンバーに咳風を吹き込み、ミストの動きを粒子画像流速計測法で解析した。マスクを使うと、ミストの速度と流動範囲とが大幅に抑制されることがわかった。今年度は、超音波風速計の代わりに超微差圧計を用いて、口直前での咳風の風圧を測定した。9 種類の安価な市販マスク(10~70 円)を使い、風圧が抑制されるかを調べると、超音波風速計での結果と同様であった。つまり、マスクの咳風への抑制効果を異なる 3 種類の方法で調べても、あらゆるマスクは咳の風圧を顕著に低下させることがわかった。咳をする患者がマスクを使えば、インフルエンザウイルスの広がりを効果的に抑制することが期待できる。

A. 研究目的

インフルエンザの(パンデミック (世界流行) は、一つのウイルスが世界中に広がって起こる。それはインフルエンザウイルスが他の風邪ウイルスより強い咳を起こすため、その咳によってウイルスがたくさんの人にうつり、世界中に広がるものと考えられる。

インフルエンザ患者が咳をしたときには、ウイルスは飛沫の中に入っているが、強い咳では飛沫が遠くに飛び、飛んでいる間に空気中で乾燥して飛沫核となる。

飛沫は約 1 メートルの範囲に飛び散り、そこにいる他の人の鼻腔粘膜、咽頭に付着して、そこから感染が始まる。一方、空中で

生じた飛沫核は小さなサイズになっているので落下せずに、遠くまで浮遊し、そこにいる非感染者がマスクをしてもそれを素通りして、ウイルスは気管支の細胞に付着して、そこから感染が始まると考えられる。

新型インフルエンザが発生したときには、流行の抑制にマスクを使うことが考えられる。それを最も効果的に行うのには、非患者が予防のためにマスクをするのではなく、咳をする患者がマスクを着用して、ウイルスの発生源において感染の広がりを抑えることである。インフルエンザウイルスの人体からの出口は口のみであるから、マスクをしてウイルスの広がりを抑えることは、患者の隔離をすると同じことである。現実

的に患者の隔離は不可能であるので、咳患者のマスク使用が低費用かつ実現可能な対策である。

どのようなマスクを使ったらよいかに関しては、我々はすでに超音波風速計を使って、安価な紙マスクでも咳風速が顕著に低下することを報告している(1)。このマスク戦略は極めて重要であると考えるので、今回は超音波風速計の代わりに高感度の風圧計を用いても同様の結果が得られるかどうかを検討した。マスクは風邪用、花粉症用の低価格(10~70円)のもの9種類について調べた。

B. 研究方法

風圧はバリサイン社の超微差圧計 DP103 (感度 25Pa)を用いた。口の直前に6センチ径のロートを持ち、ビニールパイプで風圧計とつないだ(図1)。音量はリオン社の普通騒音計 NL-20を用いて測定した。

マスクは次の9種類を使った(図2)。①紙2層、アズワン、②ガーゼ16層、興和ヘルスケア、③ポリプロピレン・ポリエチレン不織布、大三、④ポリプロピレン・ポリエステル不織布、興和、⑤ポリエステル不織布、アイテム、⑥ポリプロピレン不織布、住友スリーエム、⑦ポリプロピレン・ポリエステル・ポリウレタン不織布、小林製薬、⑧ポリプロピレン不織布、東洋化学、⑨ポリプロピレン・ポリエチレン・ポリエステル不織布、ユニ・チャーム。

風圧測定は次のように行った。まずマスクをかけて5秒おきに3回咳をして、次にマスクをはずして3回咳をした。口直前の風圧を超微差圧計からの電圧(V)として取り出し、それを0.05秒ごとにパソコンに

記録した。

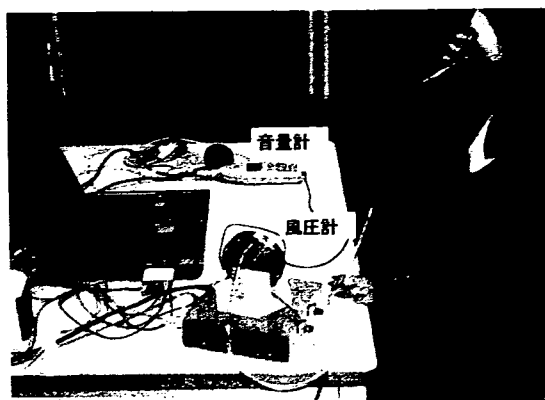


図1 咳風圧の測定

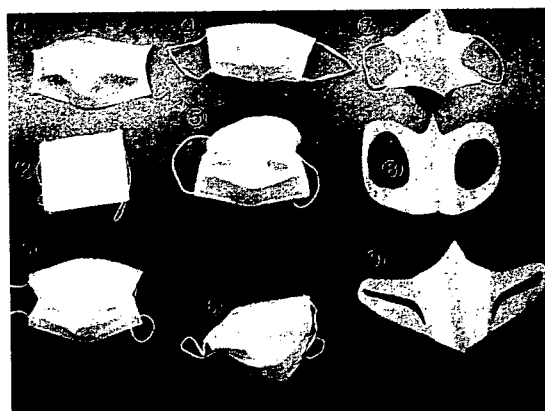
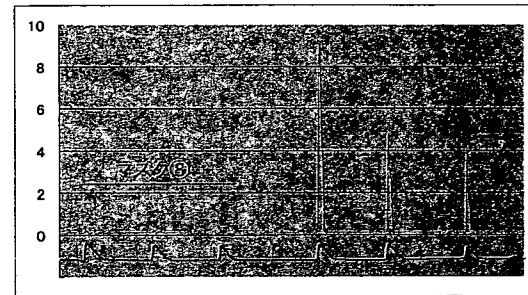
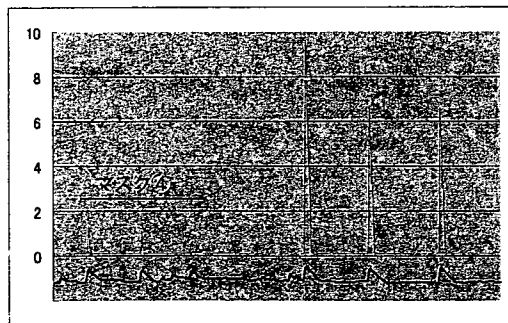
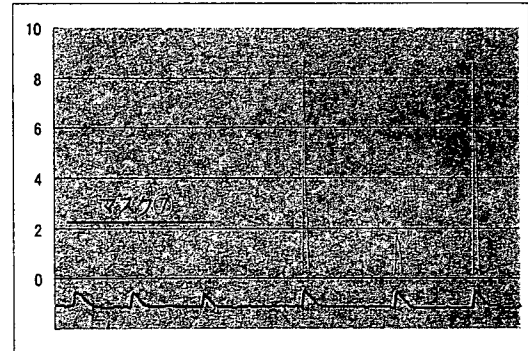
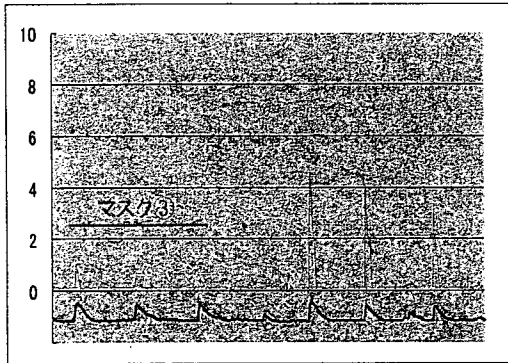
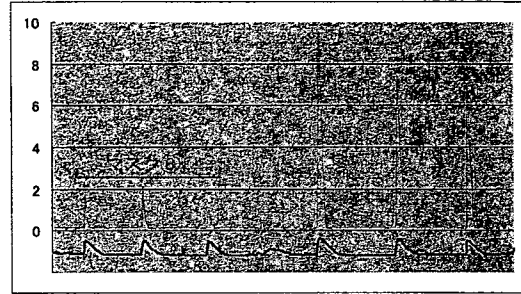
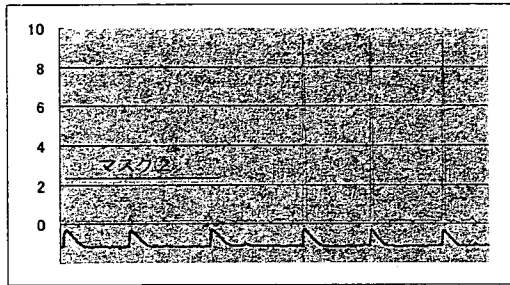
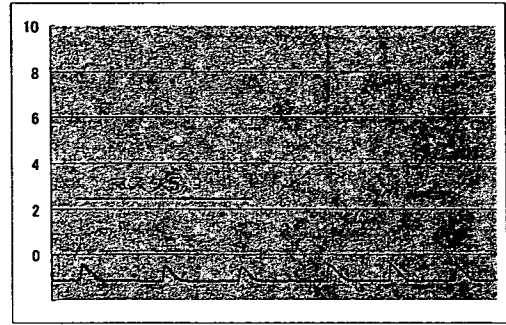
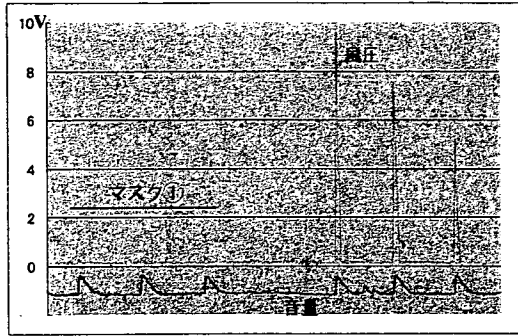
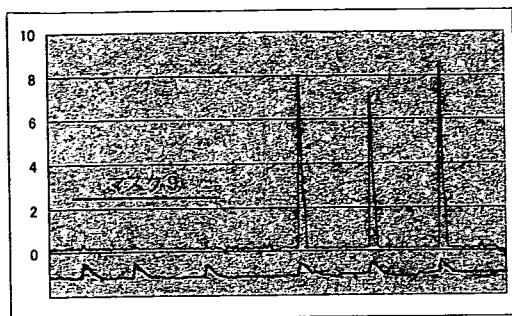


図2 マスクの種類

C. 結果

9種類のマスクによる咳風圧抑制の結果は次の図の通りである。どのマスクを着用しても、咳風圧は顕著に低下した。





D. 考察

平成 17 年度の研究では、マスクによる咳風速の低下を超音波風速計による測定で示したが、今回、咳風圧の低下も起こっていることを超微差圧計で確認することができた。マスクは風邪用、花粉症用の安価なものを 9 種類使ったが、いずれも咳風圧を顕著に抑制した。咳風圧が低下すれば咳に伴う飛沫の飛散も低下し、インフルエンザウイルスの広がりも抑制させるだろう。咳風の拡散を安価な紙マスクでも有効に抑制することがさらに確認されたと言える。吉澤ら (2) は、ネブライザーを用いてインフルエンザウイルスを含む小水滴(飛沫)をチャンバー内に散布し、低湿度空气中で乾燥させてから種々のマスクを通過させ、マスクを通過したウイルスをゼラチンフィルターに捕捉して、そのウイルス活性を定量した。結果は N95 マスクではウイルス活性の除去があったが、安価なサージカルマスクではウイルスは除去されなかった。一方、ネブライザーで生じた飛沫を直接マスクにスプレーすると、安価なサージカルマスクでもウイルス活性が低下することを観察した。小水滴中のウイルスがマスクに吸着して除去されると考えられる。つまり、乾燥した飛沫核中のウイルスは安価なマス

クを通過するが、水分を含む飛沫の中のウイルスはマスクに吸着して除去されると考えられる。

我々の研究と吉澤らの研究の結果を総合して考えると、患者がマスクをすれば、咳で口から出るウイルスはマスクに吸着し、さらに、たとえわずかのウイルスがマスクを通過したとしてもその風速・風圧は極めて低下しているため、そのウイルスが広がる可能性はマスクをしない場合に比べて極めて小さくなると考えられる。

新型インフルエンザ発生時に即座にマスクを咳患者に配布することは、流行を遅らせるだけでなく、さらには、咳を強く起こす変異株ウイルスが生じて、その広がりを抑制するだろう。

E. 結論

安価なマスクが咳風圧を大きく低下させることが確かめられた。新型インフルエンザ流行に対しマスクを備蓄し、発生時には即座に国民に配布し、咳患者に使ってもらうことは、低費用かつ効率よい対策である。

引用文献

- 1) Inouye S, Matsudaira Y, Sugihara Y: Masks for influenza patients: measurement of airflow from the mouth. *Jpn J Infect Dis* 59:179-181, 2006
- 2) 吉澤重克、伊東玲子、小船富美夫、井上栄：インフルエンザウイルスの飛沫および飛沫核に対する種々のマスクの阻止効果。BMSA 会誌, 19 巻 68-71, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし