

200726001B

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 17-19 年度 総合研究報告書

主任研究者 田代真人

平成 20 年(2008) 3 月

## 目次

平成 17～19 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. 11  
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. 15  
分担研究者：河岡義裕
3. 1. サーベイランスと危機管理体制の検討 \_\_\_\_\_ P. 18  
分担研究者：岡部信彦 研究協力者：谷口清州、木村幹男、多屋馨子、大山卓昭、砂川富正、中島一敏、重松美加、大日康史、森兼啓太、田中政宏、多田有希、安井良則、山下和予、斎藤剛仁、上野久美、佐藤弘  
2. マスクの咳風速減弱効果に関する研究  
分担研究者：岡部信彦 研究協力者：井上栄、松平晏明、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. 32  
分担研究者：高橋宜聖 研究協力者：阿戸学、小林和夫、森愛、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. 41  
分担研究者：山田章雄 協力研究者：棚林清、藤田修、堀田明豊、宇田晶彦、山本美江
6. 高病原性鳥インフルエンザウイルスの伝播におけるオオクロバエの役割 \_\_\_\_\_ P. 48  
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、津田良夫、林利則、駒形修、葛西真治、富田隆史、倉橋弘、二瓶直子、斉藤康秀、中口梓、金京純、伊藤啓史、伊藤壽啓、棚林清、堀田明豊、山田章雄、
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. 58  
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. H5 鳥インフルエンザウイルス診断法の開発と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に関する研究 \_\_\_\_\_ P. 63  
分担研究者：小田切孝人 協力研究者：影山努、氏家誠、今井正樹、二宮愛、小淵正次、板村繁之、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. 2002-2007年インフルエンザシーズンに流行したA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 P.71  
分担研究者：西藤岳彦 協力研究者：鈴木宏、齋藤玲子、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、WHO-NISN
10. 1. インフルエンザの Personal Protection に関する Evidence P.74  
2. 早期封じ込めと Mitigation Strategy  
3. 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  
4. 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-  
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.80  
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

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・19 年度総合報告書

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応用され、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

される可能性は無く、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

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

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性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、一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。

リバース・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。(8) 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。

6) 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。

7) 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。この結果を持って、さらに臨床試験を検討した。

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。

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。

8) 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。

#### 10) 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

#### 11) 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。

#### 12) 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 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、ガ

イドラインとしてまとめた。

(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出した。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)の製造に応用した。

(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 8 日以上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、5N1 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。

(7) (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。

この結果、一部にミスマッチをもつ 2 重鎖 R

NA (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。

また組織培養ワクチン開発を進め、MDCK 細胞高増殖性の NA 遺伝子を欠損 A/VietNam/1194/2004 株を作出した。さらに、病原性を規定する NS 1 に欠失をもつ弱毒型ウイルスを作成し、動物実験でワクチンとしての可能性を検討した。

(8) 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。

#### 分担研究者の成果

##### 喜田宏

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。

本研究の実施期間である 2005 年から 2007 年までの 3 年間に、日本、モンゴルにおいて採取した渡りガモ、ガンおよびハクチョウの糞便材料 4,617 検体から合計 149 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 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、中国、中近東、ヨーロッパおよびアフリカで野生水禽から分離された H5N1 ウ

イルスと 8 遺伝子分節すべてが近縁であった。

また、豚とマウスはこれらのウイルスの感染に高い感受性を示した。特に豚における増殖に、NP、M、および NS 遺伝子が関与していることを明らかにした。得られた成績は、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。

##### 河岡義裕

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産生性、供給性が減少する可能性が高い。

そこで、ワクチン供給性を高めるために、(1) 発育鶏卵での増殖性を上昇させる方法と、(2) MDCK 細胞を用いてワクチンを供給する系を開発した。

##### 高橋宜聖

新型インフルエンザ用ワクチン (NIBRG-14) が惹起する防御免疫反応の特徴を自然免疫・獲得免疫の両面からマウスモデルを用い解析した。

ウイルス感染に対する主要な自然免疫因子である IFN- $\alpha$  の産生誘導能を調べたところ、NIBRG-14 ワクチンのそれは他のサブタイプと異なる可能性が示唆された。

また、NIBRG-14 ワクチンが賦活化する獲得免疫因子を調べた結果、強毒株に対する防御免疫反応に細胞性免疫は関与せず、血清中和抗体のみで十分であることが明らかとなった。

さらに、この血清抗体の中和活性は、抗ヘマグルチニン抗体と抗ノイラミニダーゼ抗体の両者に依存する可能性が示唆された。

##### 山田章雄

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、ネコ及び各種動物由来培養細胞での強毒型及び弱毒型ウイルスの増殖性とネコ組織におけるインフルエンザウイルス受容体であるシアル酸分子の解析を行った。

鳥類由来ウイルスが弱毒強毒型に関わらずネコ由来培養細胞でよく増殖することが



わかった。また、ネコの気管、気管支さらには角膜には鳥類由来インフルエンザウイルスが指向性のあるとされている $\alpha$ 2-3結合シアル酸分子が存在することが分かった。

これらの結果は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、さら、実際のウイルス増殖、また、ウイルスの複製や出芽段階での宿主要因についても解析が必要と考えられた。

#### 小林睦生

1) ウイルスを摂食したオオクロバエの実験において14日間ほぼすべての検体からウイルス遺伝子の存在が確認されたが、活性のあるウイルスが分離された期間は摂食後24時間までであった。

2) オオクロバエの飛翔分散能力を調査する目的で標識再捕獲実験を行った。実験開始後4時間で放逐場所から1,150m離れた採集地点で1個体が捕獲され、実験開始1日後に再捕獲された9個体は放逐地点から最大2,000m、平均1,111m移動していた。

3) 2004年10月～2007年2月、西日本の4県(山口、福岡、佐賀、宮崎)で採集したオオクロバエ(合計1,887個体、96プール)からのMおよびHA遺伝子の検出を試み、2006年11月に佐賀県西有田町で採集された集団(620個体、31プール供試)の1プールからM遺伝子の断片が検出された。

4) フェニトロチオンとペルメトリンのオオクロバエ(*Calliphora nigribarbis*)に対する有効性を調査した結果、局所施用法による殺虫試験によってフェニトロチオンとペルメトリンのLD50値は、それぞれ、0.078  $\mu\text{g}/\text{fly}$  と 0.0136  $\mu\text{g}/\text{fly}$  であり、オオクロバエがこれら2つの主要な殺虫剤に対して感受性であることが示された。

5) 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オリセットネット(蚊帳)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し、接触による半数致死時間は、雌では約30秒、雄では30秒以内と推定された。

6) 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、H5N1亜型ウイルス強毒株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結果、強毒株のクロバエ体内でウイルスの生存時間は24～48時間であることが分かった。また、オオクロバエを約6週齢

のニワトリが入ったケージに放したところ、全てのハエが捕食されたことから、ニワトリは好んでハエ類を捕食することが確認された。

#### 長谷川秀樹

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。アジュバント併用不活化経鼻ワクチンによりその有効性と交叉防御能を調べた。アジュバントとして合成dsRNAであるpoly(I:C)及びNatural Killer T細胞の特異的リガンドである $\alpha$ -galactosylceramide( $\alpha$ -GalCer)を用いた。

これらアジュバントを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。

#### 小田切孝人

2005年後半からH5N1高病原性鳥インフルエンザ流行株は抗原的にも遺伝的にも2つのクレードに分類され、2006年からはクレード2に属する流行株はさらに3つのサブクレードに細分されるようになった。このことから、診断キットや遺伝子検出検査系の見直し及びプライマー等の改良が必要となったことから、全てのH5N1流行株を高感度に捉えることができる遺伝子検出検査系を開発した。

一方、インフルエンザの治療薬であるノイラミニダーゼ阻害薬(NAI)の世界最大の消費国である我が国では、耐性株の出現が懸念される。このために、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

国内でのノイラミニダーゼ阻害剤治療の普及に伴い、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する抵抗性株の出現が懸念されている。

ノイラミニダーゼ治療による抵抗性株の出現頻度を推定するために2002/03から2006/07シーズンに渡って、53名のノイラミニダーゼ阻害剤治療患者から治療前後の53組106株のインフルエンザウイルスを分離し、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を検査した。

また、2003/2004年シーズンにおいてはノイラミニダーゼ阻害剤治療を受けていない患者から分離された香港型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。2006/07シーズンにおいて、ノイラミニダーゼ治療患者からの家族間感染の疑われる症例由来の22株に関してもノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を調べた。

2003/2004年インフルエンザシーズンに分離されたAH3香港型において、本研究を通して4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必要性が示唆された。

#### 押谷仁

- 1) 新型インフルエンザ対策を考える上で必要なインフルエンザ感染そのものに関する基本的なエビデンスが欠けている。これまで存在する Personal Protection の Evidence に関する Review を行った。
- 2) インフルエンザ対策として、早期封じ込めや Mitigation Strategy が最近考えられているが、日本で実施可能であるかどうか検討されていない。そこで、日本における新型インフルエンザ対策実施に当たって、海外の感染モデルによるシミュレーションをもとに、問題点を整理した。
- 3) 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。
- 4) では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

剤耐性性との関連について考察した。

5) 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

新型インフルエンザウイルスを効率よく分離するには、複数の宿主が必要である。消化管への感染の可能性もあるため、消化器系の細胞も分離に効果的と考えられる。また、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤を汎用すると、NA 変異による耐性ウイルスの出現も懸念される。

そこで、本研究では、消化器系の細胞として、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞をモデルとして、その感染様式を MDCK 細胞と比較検討した。また、変異 NA を持つウイルスを効率よく分離するために、宿主に NA を導入した細胞の作製を試みた。

AH1 ウイルスは、Caco-2 細胞では MDCK 細胞に比して感染効率が低かったのに対して、AH3 ウイルスは、Caco-2 細胞にも MDCK 細胞と同等以上によく感染した。両細胞に $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-6$  結合シアル酸の染色性に大きな差は無いため、Caco-2 細胞において AH1、AH3 間で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、NA 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

本研究の目的は、最近の鳥強毒型 H5N1 インフルエンザ流行拡大の事態の変化に対応して、危惧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。

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、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・実用化、4) 新型ワクチン (プレパンデミックワクチンおよびパンデミックワクチン) の緊急開発・増産・供給・接種体制、5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法、6) 緊急医療サービス確保体制、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 (経鼻投与ワクチンおよび新規弱毒ワクチン開発) と治療方法の開発、8) 公衆衛生学的介入手段の比較と評価、9) 国際レベルでの

新型インフルエンザ対策・計画の比較と調整などが検討された。それらの結果から、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。

それらの成果はすべて、国の新型インフルエンザ対策における行政施策に即時応用され、新型インフルエンザ対策行動計画の改定、新型インフルエンザ対策ガイドラインなどの策定及び改定、指定感染症への指定、感染症法の改正などがなされた。

さらに、具体的な健康危機管理、社会危機管理体制の整備が進められている。

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。

また、新型インフルエンザワクチン開発については、既存の施設と技術に基づいて、緊急に安全かつ有効な H5N1 ワクチンを開発し、大量製造を可能にすることを目的として行われた。

具体的には、発育鶏卵増殖、全粒子、ホルマリリン不活化ワクチンの基本に、水酸化アルミニウムをアジュバントとして添加するものである。国内 4 メーカーおよび国立医薬品総合機構、厚生労働省との共同プロジェクトとして推進され、前臨床試験、臨床試験において満足のゆく成績が得られた。

これに基づいて製造承認が申請され、平成 19 年 11 月に製造承認が得られた。

また、プレパンデミックワクチンについては、アルミアジュバントを添加することにより、免疫原性が向上して、接種に必要な抗原量を大幅に節約できることが示された。さらに、ベトナム株ワクチンの接種を受けた成人の血清抗体は、抗原性が異なる他のクレードに属する H5N1 ウイルス（インドネシア株、青海株、安徽株など）にも交差反応を示すことが明らかとなった。このことから、プレパンデミックワクチンの備蓄政策に具体性が出てきた。

これらの成果は、国の備蓄ワクチンの作製と国家備蓄の実施に応用された。

一方、備蓄ワクチンは、保存性および保存場所の問題から、原液として備蓄されているが、

緊急事態において、アルミアジュバントを添加した最終小分け製品にするには、1~2 か月を要することが明らかとなった。さらに、ワクチンは接種後 1 か月程度経過しないと、十分な免疫は誘導されてこない。

このような状況では、せっかく備蓄をしておいても、新型インフルエンザ大流行の第 1 波には到底間に合わないことは明らかである。一方、備蓄ワクチンの有効期限も 3 年程度と推定されることから、期限前に有効活用が求められる。

さらに、基礎免疫が全くない場合には、強毒型 H5N1 多くの感染者が重症化するために、在宅治療など不可能となる可能性がある。一方、住民の 60~70%が予めある程度の免疫を持っていれば、新型インフルエンザの大流行は回避でき、健康被害の増加と社会機能の崩壊は防げるとの数理モデルも提出されている。

そこで、事前にプレパンデミックワクチンを接種して基礎免疫を賦与しておく（プライミング）戦略を検討する必要が出てきた。これについて、安全性と有効性、特にプライミングの効果について、さらに幅広い臨床データの蓄積が望まれるところである。

今後は、これらの議論に基づいた具体的な施策を検討して決めていくことになる。

## 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。⑤2001 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。幅広いウイルスに対しても交差免疫を誘導できる 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

## G. 研究発表

Members of the World Health Organization's Global Influenza Program and Collaborating Laboratories; Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia: antigenicity, antiviral drug sensitivity and vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 2005

The writing committee of the World Health Organisation (WHO) Consultation on human Influenza A/H5. Avian influenza A(H5N1) infection in humans. *New Engl. J. Med.* 353: 1374-1385, 2005

Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., Kawaoka, Y.: The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24: 3669-3676, 2006

Monto, A. S., Macken, C., McKimm-Breschkin, J. L., Hampson, A. W., Hay, A., Klimov, A., Tashiro, M., Webster, R. G., Aymard, M., Hayden, F. G., Zambon, M.: Influenza viruses resistant to the neuraminidase inhibitors detected during the first three years of their use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2395-2402, 2006

T., Ishizaki, T., Tashiro M., Odagiri, T., Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Notomi, Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection *Vaccine* 24: 6679-6682, 2006

Asahi-Ozaki, Y., Itamura, S., Ichinose, T., Steng, P., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H.,

Moriyama, M., Tashiro, M., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H.: Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes. Infect.* 8: 2706-2714, 2006

Ninomiya, A., Imai, M., Tashiro, M., Odagiri, T.: Inactivated influenza H5N1 whole-virus 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

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, M., Takahashi, H., 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., Ichinose, 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  $\alpha$ -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。本研究の実施期間である2005年から2007年までの3年間に、日本、モンゴルにおいて採取した渡りガモ、ガンおよびハクチョウの糞便材料4,617検体から合計149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高病原性鳥インフルエンザウイルスは、中国、中近東、ヨーロッパおよびアフリカで野生水禽から分離されたH5N1ウイルスと8遺伝子分節すべてが近縁であった。また、豚とマウスはこれらのウイルスの感染に高い感受性を示した。特に豚における増殖に、NP、M、およびNS遺伝子が関与していることを明らかにした。得られた成績は、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。

#### 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4,617検体から149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からH13までの13の亜型に、NA亜型はN1からN9までのすべての亜型に区分された。分離されたウイ

ルス株のHA開裂部位には強毒株のマーカーである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インフルエンザ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通りのウイルスをワクチンおよび診断に利用するために系統保存した。

モンゴル/05 (H5N1)株、モンゴル/06 (H5N1)株をマウスに接種したところ、全てのマウスが死亡した。これらのマウスの病理組織検査の結果、重篤な肺炎が死因であることが明らかとなった。また同ウイルスを豚に接種して14日間観察した。ウイルス接種の翌日から鼻汁中からウイルスが回収され、ウイルスの感染が確認されたが、豚は全く臨床症状を示さず耐過した。

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、リバーシ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) Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H (2005) Pathogenicity of H5 influenza A viruses for ducks. *Arch Virol*, 150: 1383-1392
- (2) Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T (2005) In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139
- (3) Bai G, Sakoda Y, Mweene AS, Yamada T, Minakawa H, Kida H (2005) Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiol Immunol*, 49, 1063-1067
- (4) Bai G, Sakoda Y., Mweene AS, Fujii N, Minakawa H and Kida H (2006) Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either Influenza A or B Virus infections. *J Vet Med Sci*, 68, 35-40
- (5) Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park C-H, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H (2006) Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol*, 50: 73-81.
- (6) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H (2006) Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol* 151: 1267-79
- (7) Kida H, Sakoda Y (2006) Library of influenza virus strains for vaccine and diagnostic use against highly pathogenic avian influenza and human pandemics. *Dev Biol (Basel)* 124: 69-72
- (8) 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.
- (9) Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawakawa, 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.
- (10) 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.
- (11) Shin, J. H., Sakoda, Y., Kim, J. H., Ochiai, K., and Umemura, T. (2007). Comparison of antibody titers in rabbits following immunization with inactivated influenza virus via subarachnoidal or subcutaneous route. *J Vet Med Sci* 69, 1167-1169.
- (12) 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.
- (13) 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
- (14) 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., Kokumai, N., Kawakawa, 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
- (15) 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
- ## 2. 学会発表
- (1) 「野生水禽から分離されたH7亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第140回日本獣医学会学術集会 (2005年、鹿児島)
- (2) 「野生水禽から分離されたH7亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および抗原性解析」坂部沙織、Aaron Mweene、曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005年、横浜)
- (3) 「モンゴルの野生水禽から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子および病原性の解析」三成健二、迫田義博、高桑弘樹、磯田典和、高田礼人、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)
- (4) 「鳥インフルエンザワクチンの開発1. H5N1ウイルス不活化ワクチンの免疫効果」磯田典和、迫田義博、曾田公輔、坂部沙織、今村孝、扇谷年昭、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)
- (5) 「A/chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2)株のニワトリ、アイガモおよびミニブタに対する病原性」迫田義博、津田祥美、喜田宏 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006年、名古屋)
- (6) 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.
- (7) Kida H, Sakoda Y, Isoda N, Soda K, K



ishida 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.

- (8) Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A: Genetically destined potentials for N-linked glycosylation associated with antigenic changes of influenza virus hemagglutinin. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (9) 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.
- (10) 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。

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:** 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産生性、供給性が減少する可能性が高い。そこで、ワクチン供給性を高めるために、(1)発育鶏卵での増殖性を上昇させる方法と、(2)MDCK 細胞を用いてワクチンを供給する系を開発した。

### A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザは拡大の一途をたどっている。また、H5N1 ウイルスに対抗する武器である抗インフルエンザ薬（NA 阻害薬：タミフル）に対する耐性ウイルスの出現も報告されている。このような状況下、H5N1 ワクチンの開発も臨床段階にまで進んでいる。しかし、その有効性は未知数であり、また、実際にパンデミックが起こったときの生産力、供給量に関する不安点も指摘される。すなわち、発育鶏卵をその製造母体とする現在のシステムでは、発育鶏卵の安定した供給が大前提であるが、実際のパンデミック発生時にはその供給量が減少する事態となることは容易に想像できる。一方、H5N1 不活化ワクチンのヒトに対する免疫原性の低さが指摘されており、十分な免疫を付与するためには、より多くの抗原量を必要とする。そのため、(1) 発育鶏卵での増殖性に優れる H5N1 ワクチン製造株の作製の開発と、(2) 発育鶏卵に代わり培養細胞（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

(1) 「発育鶏卵での増殖性に優れる H5N1 ワクチン製造株の作製」

リバーシジェネティクスにより PR8 株（高増殖性）と WSN 株（低増殖性）との間で遺伝子交雑体を作製し、それらの鶏卵での増殖性から、PR8 株の高増殖性決定因子を同定した。次に、2004 年 H5N1 ヒト分離株 VN1203 の弱毒改変型 HA 分節と、他の株（HK213、HK483、Kanagawa、WSN、PR8）由来の NA（全て N1 亜型）分節あるいは stalk 領域の改変を伴う NA 変異体（VN1203 由来）をもつ PR8 ドナー株との遺伝子交雑体を Vero 細胞で作製し、それらの鶏卵での増殖性を比較した。

(2) 「MDCK 細胞を用いてワクチンを供給する系の開発」

野外流行株である A/VietNam/1194/2004 株を用いて、NA を欠損させたウイルスを作製し、MDCK 細胞で継代を繰り返すことにより、MDCK 細胞で効率よく増殖する NA 欠損ウイルス（VN1194HAAvrNA-株）を作出し、この株の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

(1) PR8 株の鶏卵高増殖性は、ウイルス RNA ポリメラーゼ PB1 蛋白質の機能と膜糖蛋白質（HA-NA バランス）により決定されることが分かった。NA 改変型組み換えウイルス（6:2 reassortant）は、作製した全てのウイルスで増殖性の上昇は見られなかった。しかし、PR8 株由来の NA を持つ組み換えウイルス（つまり 7:1 reassortant）では、それらに比べて 3~4 倍の有意な増殖性の上昇が認められた。これらの結果から、7:1 reassortant（HA 分節のみ流行株由来）が、従来型の 6:2 reassortant（HA および NA 分節の両方が流行株由来）より、鶏卵増殖性に優れることが明らかとなった。

(2) 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。このウイルス株  $10^5$  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ルの 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、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

(1) 7:1 reassortant (HA 分節のみ流行株由来) の H5N1 ワクチンシード候補株としての応用は、従来型の 6:2 reassortant (HA および NA 分節の両方が流行株由来) に比べ NA 蛋白質に対する特異的防御反応が減少する可能性はあるが、組み換えウイルス作製過程の簡略化、時間の節減、また発育鶏卵供給量減少時には有利に働くと考えられる。

(2) VN1194HAAvrNA 一株は、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

本研究で得られた発育鶏卵での増殖性を高める知見や、作製した NA 欠損ウイルス (VN1194HAAvrNA 株) 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

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Rev microbial* 3:591-600, 2005.

Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sundén Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol* 50:73-81, 2006.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439:490-492, 2006.

Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. Hierarchy among vRNA segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* 80:2318-2325, 2006.

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80:5233-5240, 2006.

Chen H, Li Y, Li Z, Shi J, Shinya K, Deng G, Qi Q, Tian G, Fan S, Zhao H, Sun Y, Kawaoka Y. Properties and dissemination of H5N1 viruses

isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J Virol* 80:5976-5983, 2006.

Muramoto Y, Le TQ, Phuong LS, Nguyen T, Nguyen TH, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *J Vet Med Sci* 68:527-531, 2006.

Kogure T, Suzuki T, Takahashi T, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y. Human trachea primary epithelial cells express both sialyl( $\alpha$ 2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl( $\alpha$ 2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj J* 23:101-106, 2006.

Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440:435-436, 2006.

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 Pathol* 3:1374-1379, 2007.

Rigoni M, Shinya K, Toffan A, Milani A, Bettini F, Kawaoka Y, Cattoli G, Capua I. Pneumo- and eueotropism 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.

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

堀本泰介、村本裕紀子、藤井健、山田晋弥、岩附研子、城野洋一郎、河岡義裕「インフルエンザ不活化ワクチンの製造基材である発育鶏卵でより効率良く増殖する H5N1 ワクチンシードウイルス候補株の作出」第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月

## 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