

平成 17-19 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

「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」

「新型インフルエンザウイルスの予防法・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：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。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 α -galactosylceramide (α -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。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパ、アフリカにまで広がりヒトに感染した場合に高い致死率をしめしている。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と危惧され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しそのメカニズムを明らかに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 及び A/Kyoto を用いてマウス感染実験を行った。また交叉防御の実験では A/PR8 (H1N1) のスプリットワクチンを用いた。H5N1 のワクチン株としてはリバース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 μ l づつ両鼻腔内に接種した。交叉防御の実験

においては A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N1), B/Ibaraki ウイルスを 1000pfu を経鼻接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL2 及び BSL3 動物実験施設でおこなった。

アジュバントの調整

経鼻粘膜ワクチンのアジュバントとして合成二本鎖 RNA (polyI:C) 及び Natural Killer T 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) を用いた。

マウス

免疫実験及び感染実験に用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウス (メス) 及び NKT 細胞欠損の J α 281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用いた。

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 μ g のワクチンを 0.1~10 μ g の poly(I:C) アジュバント及び α -galactosylceramide (α -GalCer) 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 及び H1HA 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 (α 鎖) または IgG (γ 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, H1-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。

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や病原性の特徴として感染の早い時期に頸部リンパ節で感染性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や初期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大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、さらに大脳へと広がっていくと考えられる。

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ス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を調べた。不活化全粒子ワクチン 1 μ g と共に poly(I:C) を 10 μ g 1 μ g 0.1 μ g を経鼻投与した場合、または poly(I:C) 10 μ g と不活化全粒子ワクチンを 0.5 μ g 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。

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。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。

1. α -galactosylceramide (α -GalCer) 併用経鼻ワクチンによる免疫応答と感染防御

Natural Killer T (NKT) 細胞のリガンドである α -GalCer をアジュバントに用いたインフルエンザワクチンについてその免疫応答を調べた。またそのアジュバント作用の特異性を調べる為にはマウスは野生株の BALB/c マウスと NKT 細胞欠損の J \cdot 281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用い毒素系アジュバントのコレラトキシン B サブユニット (CTB) と比較した。ワクチンとアジュバントを 2 週間間隔で 2 回経鼻接種しその後の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を図 1 に示す。野性株マウス及び J・281 遺伝子欠損マウスにおいては A/PR8 ワクチンと溶媒 (vehicle) のみを経鼻接種した群においては鼻腔洗浄液中の IgA 抗体及び血清中の IgG 抗体は認められず、感染後のウイルス価は 10^3 PFU/ml 以上認められた。一方 α -GalCer をアジュバントに用いた時野性株マウスでは鼻腔洗浄液中に PR-8 特異的分泌型 IgA 抗体および血中に IgG 抗体が誘導され攻撃感染後のウイルス価が有意に減少したが J α 281 遺伝子欠損マウスにおいては抗体応答は全く認められず攻撃感染後のウイルス価は 10^3 PFU/ml 以上であった。CTB* をアジュバントに用いた群では共に抗体応答と感染防御が認められた。

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ワクチンとしてリバース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。 α -galactosylceramide (α -GalCer) 及びその誘導体の粘膜アジュバント作用を調べる目的で A/PR8 (H1N1) のスプリットワクチンを用いた。アジュバントには Natural Killer T 細胞のリガンドとして知られる α -galactosylceramide (α -GalCer) R0 及びその誘導體 R8 を用いた。

A/Vietnam (H5N1) 由来の NIBRG14 全粒子不活化ワクチンをワクチン単独および α -GalCer と共に経鼻接種しその後の鼻腔洗浄液中の A/Vietnam (H5N1) 特異的分泌型 IgA 抗体および血中の IgG 抗体を調べた。結果を図 4 に示す。図に示す如く α -GalCer 併用群において非併用群に比べ鼻腔洗浄液中の IgA 量が 3 倍に増加し A/Vietnam (H5N1) ウイルスによる攻撃感染に対し、5 匹中 4 匹では感染の完全防御、1 匹で鼻腔中にウイルスを認めたがウイルス価はコントロールと比較し 100 分の 1 以下で生存は 100% であった。 α -GalCer 非併用群では 5 匹中完全防御は 2 匹で生存率は 90% であった。

また、 α -GalCer 併用経鼻ワクチンによる交叉防御能を調べる為に抗原性の異なる H5N1 (A/HK/483/97) 株による攻撃感染実験を行った。アジュバントを用いないワクチンのみの群では非免疫群と同様に全てのマウスが死亡したが α -GalCer をアジュバントとして併用したグループにおいて

は 100% の生存が確認された。 α -GalCer 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 年違い抗原性の異なる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。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 及び α -GalCer 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とも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

とくになし。

G. 研究発表

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, Hirama 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** 2006 Apr;12(4):466-472.
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**, 2006 Feb 17;340(3):807-14.
7. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. **J Med Virol**, 2006 78:954-963.
8. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Takatsugu-Yokota Y., Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology** 2006 Aug;20(8):1329-31. 2006 May 5; [Epub ahead of print].
9. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. **Microbes and Infection**. 2006 Sep;8(11):2647-56. 2006 Aug 8; [Epub ahead of print]
10. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H*., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. **Microbes and Infection** 2006 Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub ahead of print]
11. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. **Adv Exp Med Biol**. 2006;581:515-8.
12. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. **Adv Exp Med Biol**. 2006;581:593-6.
13. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. Expert Review of Vaccines, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
14. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. Expert Review of Vaccines, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
15. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. **J Med Virol**. 2007 Jun;79(6):811-819
16. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and

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 DIIs 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—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—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 DIIs 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
 9. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第10回日本ワクチン学会学術集会 平成18年10月21日-22日 大阪
 10. 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、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
 11. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈緒子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
 12. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染抑制効果 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
 13. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、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交叉防御効果の検討 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
 14. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21st-25th May 2008 Hakone
 15. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会 (2007年11月横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 (出願)
なし
 2. 実用新案登録
なし

平成 17-19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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

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、氏家誠、今井正樹、二宮愛、小淵正次、板村繁之、島袋梢、望月菊

国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室

堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲

製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部ゲノム解析部門

川上千春 横浜市衛生研究所

研究要旨 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わが国では、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。

A. 研究目的

東アジア諸国の家禽で流行が始まった H5N1 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1-HPAI) は、4 年が経過した現在ではユーラシア大陸全域に広がり中国、ロシア、モンゴル、中東、ヨーロッパ、アフリカまで流行が波及した。東南アジアなど多くの国では家禽は養鶏場のように密集飼育されているものは少なく、大多数は裏庭飼育であり、このため H5N1-HPAI ウイルスの蔓延規模を正確に把握することは不可能である。また、H5N1-HPAI ウイルスはもはや家禽に定着してしまっていることから、本ウイルスによる流行を制御し封じ込めることは不可能となっている。

一方、ヒトでの感染例も家禽での流行と並行して増加の一途をたどり、現時点で 14 カ国 373 人の感染例と 236 名の死亡が確認されている。これら感染者の多くは依然として東南アジア諸国に多く、この地域が H5N1-HPAI に由来する新型インフルエンザの発生源となる可能性が懸念される。

感染者から分離されるウイルスは、未だに鳥型の性状を維持しており、人から人への感染は

今のところ家族内感染に限定され、効率的なヒト-ヒト感染は報告されていない。一方、H5N1 流行株は 2005 年後半からは抗原的にも遺伝的にも複数の異なるグループに分かれてきている。さらに、2006 年からはクレード 2 に入る H5N1 ウイルスは少なくとも 3 つのサブクレードに分岐し、現在ではこれらクレード 2 ウイルスが世界的な流行の主流となっている。

2007 年からは中国南部で主に流行していたクレード 2.3 の H5N1 ウイルスがクレード 1 ウイルスが主流であった東南アジア諸国にも蔓延し始め、同一地域で異なる H5N1 ウイルスが共存するようになってきた。

このことは、これまで特定のクレードのウイルスを高感度に捉えるプライマーを採用した検査キットでは異なるクレードのウイルスを見逃すことになる。そのために、全ての H5N1 流行株を確実に捉える遺伝子検出用プライマーの再設計とキットを緊急に開発する必要性が出てきた。感染研ウイルス 3 部インフルエンザウイルス室では、このような流行状況に対処するために、新たにコンベンショナル RT-PCR 系、Real-time RT-PCR 系および H5-LAMP からなる遺

伝子検出診断系を開発した。

一方、我が国では 2001 年にインフルエンザ治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬 (NAI) の oseltamivir 及び zanamivir が販売認可を受けて以来、oseltamivir 阻害薬の臨床での使用量は全世界の生産量の 50~70% を占め、世界第一位の使用量となっている。このことから、これら阻害剤に対する耐性株の出現を継続的に監視する必要が出てきた。さらに、2007 年 11 月以降から、A/H1N1 ウイルス NA 蛋白に H275Y 耐性マーカを持つ oseltamivir 耐性株が、ノルウエーの 64% を筆頭に EU 諸国全体でも全分離株の 20% 以上を占めるようになった。これらの耐性株は oseltamivir を使用していない患者から分離されていることから、自然発生的な耐性変異株である。このため、WHO グローバルインフルエンザサーベイランスネットワークでは、全世界的な NAI 耐性株サーベイランスを強化し、各国における耐性株出現頻度と耐性株の性状把握を開始した。

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。これらの系を用いて 2007/2008 シーズンの市中分離株について性状解析を行った。

B. 研究方法

1. RT-PCR プライマーの改良

クレード 1 およびクレード 2.1~2.3 に分類される H5N1 鳥インフルエンザ流行株を検出できるように、RT-PCR に用いるプライマーを再設計した。また、従来の two-step PCR 法から one-step 法に改良し、反応系を簡便化した。

2. Real-time RT-PCR 系の構築

上記の RT-PCR 用プライマーをそのまま使用できる SYBER Green I 法を採用した系を開発した。

使用機器としては、世界中に広く普及しているロッシュ社のライトサイクラーおよびバイオラド社のクロモ 4 で至適化した。

3. H5-LAMP 検査キットの評価

前年度に開発した H5-LAMP キットは現行の流行株にどの範囲まで対応できるか、各種クレードウイルスとの反応性を検討した。

4. 2006/2007 シーズン分離株

全国地方衛生研究所 (地衛研) 及び周辺アジア諸国で 2006/2007 シーズンに分離され、感染研に分与された A/H1N1 型 (98 株)、A/H3N2 型 (204 株)、B (143 株) について NITE と共同で NA 遺伝

子解析を行い、既知の耐性マーカをもとに耐性株の同定を行った。

5. 2007/2008 シーズン分離株

地衛研及び周辺アジア諸国で 2007/2008 シーズン (2008 年 2 月 20 日現在) に分離され、感染研に分与された A/H1N1 型 (102 株)、A/H3N2 型 (31 株)、B (6 株) について、zanamivir 及び oseltamivir 存在下、NA-star (Applied Biosystem 社) を用いた NA 酵素活性の測定を行った。50% NA 酵素活性阻害濃度 (IC50) は MikroWin 計算ソフトにより算出した。IC50 値の 25-75% が存在する幅を interquartile range (IQR) と呼び、その下限及び上限から $5 \times \text{IQR}$ 異なる値を示したものを限外値と呼ぶが、そのような値を示したものに関して優先的に NA 遺伝子の解析を行った。その他の株は NITE と共同で NA 遺伝子解析を行い、これらの情報をもとに耐性株の同定を行った。

C. 研究結果

1. 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)、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。

2. 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ツ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年と比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。

3. Real-time PCRによる高病原性H5N1鳥インフルエンザ遺伝子診断法の構築

RT-PCRと同じプライマーを採用したSYBR Green I法を用いたReal-time RT-PCR検出系を開発した。これらの詳細を記載したマニュアルは、病原体検査マニュアル「高病原性鳥インフルエンザ」(2006年6月改訂版)として全国の地方衛生研究所検査担当者へ配布された。さらに、全国主要検疫所職員を感染研に招聘し、本マニュアルを用いた検査法の研修を行った。これによって、国内で同ウイルスによる流行が発生した場合や空港、港で感染者が見つかった場合は、感染診断検査を担当部署で迅速に行うことが可能となっている。

一方、WHOの診断検査マニュアルの改訂が進められているが、感染研の最新版遺伝子検査法が世界の標準検査マニュアルとして採用されることが検討されている。

4. H5-LAMP検査キットの評価

感染研と栄研化学とで共同開発し市販されているH5-LAMP検査キットが、現行の複数のクレードのH5N1流行株全てに対応可能か否かを検証した。その結果、クレード1およびクレード2.1(インドネシア株)には高感度に反応するが、それ以外のクレード2.2、2.3との反応性は顕著に低下することが判明した。

現在、反応性が低いクレードのウイルスに高感度に反応するようにプライマーおよび反応液組成等の改良を行っている。

5. 2006/2007シーズン分離株の遺伝子解析による薬剤耐性株マーカーの検索

NA遺伝子のアミノ酸配列にもとづく分析の結果、当該シーズンに分離された株に既知の耐性マーカーを持つ株は検出されなかった。

6. 2007/2008シーズン分離株薬剤耐性株サーベイランス

・インフルエンザウイルス薬剤感受性の測定(NAI assay)系の構築
インフルエンザウイルスの薬剤感受性の測定

は、段階希釈したNAI存在下、ウイルスのNA活性を測定しIC50を算出することで行われる。NA活性測定は、使用する基質により蛍光発光法と化学発光法に大別されるが、再現性・簡便性・感受性の面で化学発光法のほうが優れている事が報告されている(Wetherall et al., JCA 41. 2003.)。よって、感染研でもNA-star(Aplied Biosystem社)を酵素基質として用いた化学発光法を採用した。測定法の妥当性を評価するため陽性コントロールとして、Oseltamivirに対して既知の耐性マーカー(H275Y)を持つA/北九州/10/2006(H1N1)と、Zanamivirに対して既知の耐性マーカー(H155Y)をもつA/北海道/15/2002(H1N1)を用い、陰性コントロールとしてそれぞれに対応する感受性株を用いて各株のIC50値の測定を行った。この結果、これらの耐性株は、薬剤感受性株と比べ、明らかなIC50値の増加が認められ、かつIC50値に高い再現性が得られた(表2)。その他、代表的な耐性マーカーE119V(H3N2)、R292K(H3N2)、R152K(B)を持つ耐性株を用いてIC50値を測定したところ全ての耐性株で明らかなIC50値の増加が認められた。このことから、感染研で確立したNAI assay系は既知の耐性株を容易に検出する事が可能であると判断した。

・市中分離株からの迅速な薬剤耐性株の同定
市中分離株から迅速に耐性株を同定するために、地衛研から分与され感染研で増殖した分離株は、最初にNAI assayを行い、IC50値が限外値を越えるものを優先してNA遺伝子解析を行った。この方法により、分離株を増殖してから1~2週間以内に耐性株の同定が可能となり、市中分離株の迅速なモニターが可能となった。

・2007/2008シーズンの解析結果
NAI assay及びNA遺伝子のアミノ酸配列にもとづく分析の結果、当該シーズン(2008年2月20日現在)に分離された株について、H1N1は102株中5株(4.9%)、H3N2は31株中0株(0%)、B型は6株中0株(0%)の耐性株が見つかった。H1N1の5株の耐性株は既知の耐性マーカーのH275Yを持っていた(表3)。

・国内分離H1N1耐性株の性状解析
現在流行中のA/H1N1株はNA遺伝子系統樹上で2B(G249R/K、T287I、G354D)または2C(S82P、M188I、D344N、L367I、V393I、T453I)の2つのサブクレードのどちらかに属すが、H275Yをもつ耐性株は国内分離株・海外分離株共に全て2B

に属する(図1)。一方、2B内では、北欧で流行している耐性株(D354G)とは異なるクラスターを形成しており、国内耐性株は大もとのウイルスが北欧系ウイルスと少し異なると考えられる。また、5株の耐性株のうち2株について感受性株とIC50値を比較したところ、Oseltamivirに対して100倍以上の増加が認められた。一方、Zanamivirに対しては感受性株と同様の値であった。

D. 考察

高病原性H5N1鳥インフルエンザの流行は制圧できないことから、今後も家禽での流行は頻発することが予想される。これと並行して人への感染例も増え続け、抗原性も遺伝子配列も異なるH5N1ウイルスがどんどん出現してくるものと思われる。新型インフルエンザ対策の上では、流行株の性状や変化を適宜捉えるために、正確な感染診断を行うことが求められ、それに対応できる検査キットや試薬類の開発が期待されている。

特に、遺伝子検出検査系では、流行株に対して想定している検出感度が維持できているかを常に把握しておく必要がある。そのために、複数種の検査法を確立しておき、それらの利点および欠点をよく理解し、上手に組み合わせて最高の検出感度で診断検査を実施することが大切である。

本研究において改良され、さらに新たに構築された検査法は今後新しいH5N1ウイルスが出現するたびに更新していくことになる。それらの情報は随時関連諸機関と共有され、新型インフルエンザ対策の上で有効活用されることが望まれる。

一方、本研究で、全国規模でのNAIサーベイランス系の基礎が確立された。しかしながら、以下の改善点が残された。1) アッセイ系の問題：NAI assayは採用するNA酵素活性測定法、使用するIC50値算出ソフトによって、同一サンプルでもIC50値が大きく変わる事が知られている(Wetherall et al., JCA 41. 2003)。そのため、各機関で個別のIC50値が算出されたとしても、その値を一概に比較する事ができない。この問題を解決するために、参照株として使用する耐性株を選定し各機関で統一化をはかる必要がある。2) 迅速化の問題：現在の我が国の株サーベイランスでは地衛研の分離株の情報を受けて、感染研がそれらの株の分与依

頼をする。そのため、地衛研がウイルスを分離してから、感染研がその分離株を受け取るまでに1ヶ月以上のタイムラグが生じる。従って、更なる迅速化には、分離株の分与に伴うタイムラグを出来るだけ短縮する必要がある。一方、今回の横浜市衛生研究所の協力に見られるように、地衛研でNA遺伝子の解析を行う事により、迅速な耐性株の同定が可能であった。このことから、今後は地衛研を含んだ国内のNAIサーベイランスネットワークの構築も必要である。3) 耐性株は、感受性株と比べてIC50値が10倍程度増加するものから1000倍以上増加するものまで、耐性マーカーに依存して幅広い耐性度を示すため、全ての耐性株を同等に論じるのは問題がある。今後も新たな耐性マーカーが同定される可能性があるが、臨床的に重要な耐性株なのか感染性・増殖性・動物内での薬剤感受性など詳細な解析を行い、慎重な見極めが必要である。

F. 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.* 87, 479-487, 2006
- Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, 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(17):3669-76, 2006.
- 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* 10, 6679-6682, 2006
- Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J. Virol. Method* 141, 173-180, 2007
- Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri 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
- Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J. Virol. Method* 141, 173-180, 2007
- Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri 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, 3557-3560, 2007
- Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T. Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol.*;88(6):403-14, 2007.
- Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-819, 2007
- B. Darmma, A. Klimov, T. Odagiri, A. Burma, S. Tsatsral, N. Naranbold, D. Enkhsaikhan, P. Nymadawa. Characteristics of influenza virus epidemic strains in 2005-2006 season in Mongolia. *Mongolia J. Infect. Dis. Res.* 14, 2-6, 2007
- Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, 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.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20
- 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 C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1333-40.
- Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-9, 2007.

Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri
Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein
plays critical roles in production of infectious virus.
J. Virol.82, 728-739, 2008

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. 10th 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 回東海北陸プロ
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)
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 18 年度鹿児島県職員
臨床検査技師技術研修会 鹿児島 6 月 9 日
(2006)

一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田
代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀
樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥イン
フルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 日
本ワクチン学会 大阪 10 月 (2006)

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井
正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2005/06 シー
ズンのインフルエンザ流行株と平成 18 年度のワ

クチン株 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典子、川口晶、岩田奈緒子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) の感染防御効果 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、板村繁之、小淵正次、小田切孝人、田代真人 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス拡散検出検査系の構築 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

今井正樹、二宮愛、川崎一則、小田切孝人 B 型インフルエンザウイルスの感染性粒子形成過程における BM2 蛋白質の役割 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

二宮愛、今井正樹、多田善一、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 54 回日本ウイルス学会、名古屋、11 月 (2006)

Takato Odagiri, Masaki Imai, Tsutomu Kageyama, Ai Ninomiya, Makoto Ujike, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Masato Tashiro Generation and update of laboratory diagnosis systems for H5N1 highly pathogenic avian influenza. US-Japan CMSP Singapore Conference, November, 2006.

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 18 年度稀少感染症診断技術研修会 2 月 (2007)

Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri The cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles for the production of influenza virus. Options for the Control of Influenza VI, Tronto, June, 2007.

CA Russell, TC Jones, IG Barr, NJ Cox, K Fukuda, V

Gregory, I Gust, AW Hampson, AJ Hay, AC Hurt, JC de Jong, AI Klimov, AS Lapedes, YP Lin, A Mosterin, T Odagiri, ADME Osterhaus, GF Rimmelzwaan, MW Shaw, E Skepner, K Stohr, M Tashiro, WQ Zhang, RAM Fouchier, DJ Smith Global patterns in the evolution and epidemiology of influenza A(H3N2) virus from 2002 to 2007. Options for the Control of Influenza VI, Tronto, June, 2007.

Takato Odagiri International support for influenza surveillance and control in Lao PDR. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

・Takato Odagiri Update of influenza surveillance information and vaccine strain selection-Northern and Southern Hemisphere. NIC review Meeting at Vientiane, Lao PDR. October, 2007.

小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2006/07 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 19 年度のワクチン株 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・川上千春、小淵正次、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代真人 インフルエンザ市中流行株における NA 阻害薬耐性 A 型ウイルスの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

高橋宣聖、阿戸学、北原玄太、二宮愛、小田切孝人、田代真人、小林和夫 H5N1 型プレパンデミックワクチンによる感染防御メカニズムの解析 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

今井正樹、影山努、氏家誠、納富継宣、峰川晴美、田代真人、小田切孝人 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法による H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検出系の開発 II 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人、小田切孝人 Real-time RT-PCR 法による H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス核酸検出系の構築 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎 マウスにおけるプレパンデミックワクチンによるプライミング効果の検討 第 11 回日本ワクチン学会 横浜

12 月、2007

G. 知的所有権の取得状況

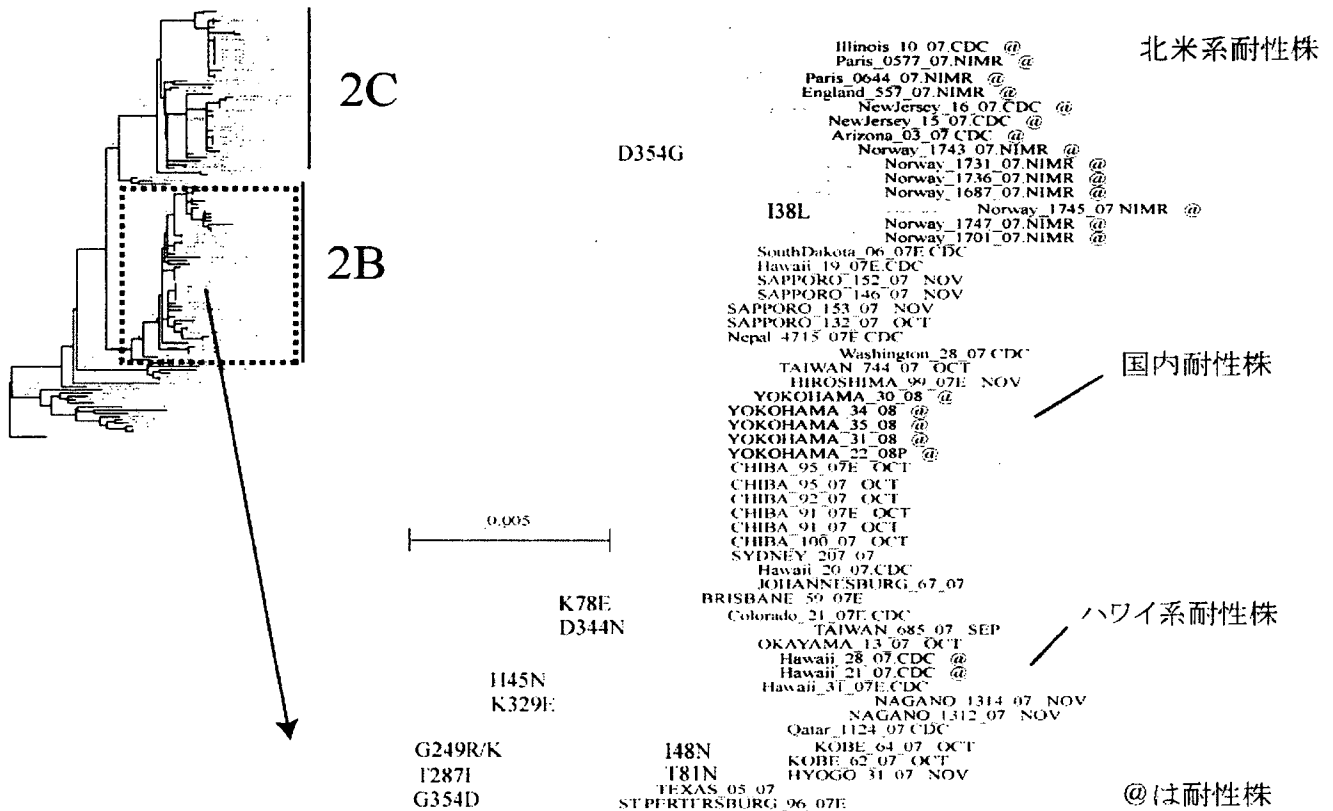
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表3. 2007/2008シーズン分離株のNAIアッセイとNAシーケンス要約

ウイルス型/亜型	解析数	ウイルス分離国		NAIアッセイ			IC50値			NAシーケンス要約		
				解析数	zanamivir	Oseltamivir	解析数	zanamivir (中央値)	Oseltamivir (中央値)	解析数	耐性マーカー*	耐性株数/解析総数
N1NA	102	解析株 分離株総数(国内)	100 / 1749 (5.7%)	99	0.99	2/99**	99	0.22	0.00	76	Y155H	0/76
		韓国	1								C246R, I266V	0/76
		台湾	1								H274Y	5/76**
N2NA	31	解析株 分離株総数(国内)	18 / 96 (18.8%)	31	0.31	0.31	31	1.82	0.11	29	E11G	0/29
		台湾	13								E119V	0/29
											Q226H	0/29
BNA	6	解析株 分離株総数(国内)	1 / 18 (22.2%)	6	0.6	0.6	6	0.83	3.56	6	R292K	0/29
		中国	1								N294S	0/29
		台湾	1								R152K	0/6
											D198E	0/6
											D198N	0/6
											I222T	0/6
											S250G	0/6
											G402S	0/6

*N2 numbering

** NAシーケンスでH274Yを確認した5株のうち2株をNAIアッセイした。3株は未解析



ウイルス	耐性マーカー	IC50値	
		Oseltamivir	Zanamivir
A/横浜/34/2008 (H1N1)	Y275 (耐性株)	33.29 (107倍)*	0.38 (0.73倍)
A/横浜/35/2008 (H1N1)	Y275 (耐性株)	37.37 (120倍)	0.46 (0.88倍)

* 同時に測定した陰性コントロールのIC50値を1.0としたときの倍率

図1: 国内耐性株の系統樹解析とIC50値測定結果

平成 17-19 年度厚生科学研究費補助金新興再興感染症研究事業
分担研究総合報告書

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

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 鈴木宏、齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座公衆衛生分野
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 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。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルスによるインフルエンザの大流行（パンデミック）発生時に、健康および社会的被害を低減させる為に新型用ワクチンおよびノイラミニダーゼ阻害剤が使用が考えられている。しかし、新型用ワクチンは新型インフルエンザウイルスが発生してから、その抗原性の解析、ワクチン製造株の作成、およびワクチンの製造と言った複数の段階が存在するため新型発生初期段階にはワクチンが供給できないと考えられている。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低いと考えられていた。しかし、Kiso らの報告 (Lancet 2004, 364 759-765) によって、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、免疫学的にナイーブな宿主において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が示唆された。

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

とが大変重要である。本研究では、平成 17 年度には、市中分離株中のノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現頻度を調べる目的で、全国の衛生研究所で分離された 2003-2004 年インフルエンザシーズンに流行した A 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。また、平成 18 年、19 年度にはノイラミニダーゼ阻害剤治療による耐性株出現の頻度を調べる目的で 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。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。

B. 研究方法

平成 17 年度：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ル）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。

平成 18, 19 年度：新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生分野において 2002/03 から 2006/07 インフルエンザシーズンにインフルエンザ感染により医療機関を受診した患者を対象とし、ノイラミニダーゼ阻害剤治療前およびノイラミニダーゼ阻害剤投与後の再診時に患者から検体を採取し、ウイルス分離を行った。

また、家族間感染例からのウイルス分離例としては、京都の一般医療機関を受診し、ノイラミニダーゼ阻害剤治療を受けた患者 20 名と、その患者からの家族間感染と考えられる患者 22 名からそれぞれ初診時に検体を採取し、ウイルス分離を行った。

ノイラミニダーゼ阻害剤であるタミフル活性体 (GS4071) およびザナミビアのノイラミニダーゼ活性 50 % 阻害濃度は、蛍光基質 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) を用いた蛍光測定法によって動物衛生研究所で測定した。陽性対照として、バージニア大学 Larisa V. Gubareva 博士 (現 CDC) より分与された A/Texas/36/91 (H1N1) 親株および H274Y 変異株、A/Texas/131/02 (H3N2) 親株および E119V 変異株、B/Memphis/20/96 親株および R152K 変異株を用いた。

C. 研究結果

平成 17 年度に検査した香港型 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 (表 1)。

図 1

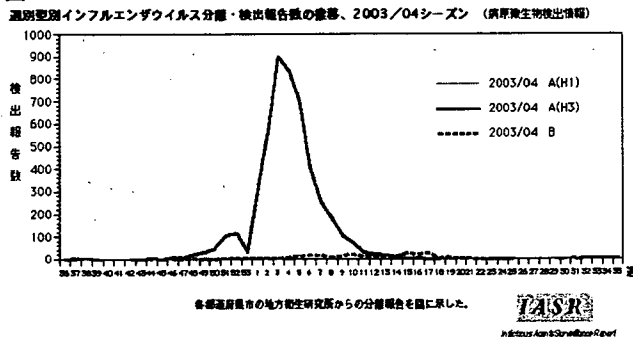


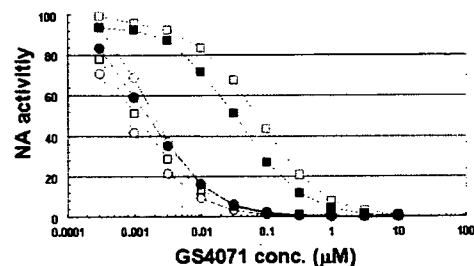
表 1: NA の型・亜型別 IC50 (nM).

Type/subtype	Date	2003-2004 シーズン
N2	サンプル数	1142
	IC50 中間値	0.81
	IC50 の上限 3/4 値	1.22
	IIC50 の下限 1/4 値	0.56
	最大値	9611.22
	最小値	0.07
	極限外値	3
	弱限外値	12(0)
B	サンプル数	171
	IC50 中間値	12.4
	IC50 の上限 3/4 値	18.32
	IIC50 の下限 1/4 値	10.04
	最大値	60.66
	最小値	1.98
	極限外値	0
	弱限外値	8(0)

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が分離された患者は、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株は、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った。

平成 18, 19 年度に解析したノイラミニダーゼ阻害剤治療前後の分離株 53 組 106 株 (H1 2 組、H3 34 組、B 型 17 組) については、H3 亜型の分離された一例において、治療前後で著明な IC50 値の上昇が認められた (図 2: ●治療前分離株、■治療後分離株、○A/Texas/131/02 (H3N2) 親株、□A/Texas/131/02 (H3N2) E119V 変異株)。



この症例はタミフルの 4 日間投与を受けた 6 歳児であった。治療前後のウイルスの IC50 を比較したところ、GS4071 の IC50 が 1.63nM (治療前ウイルス) から 19.9nM (治療後ウイルス) と、治療後ウイルスに

において12倍に上昇していた。

家族感染例からの分離株42株(初発患者由来20株、家族間感染患者由来22株)に関してはいずれの株においても、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性の低下は認められなかった。

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、ノイラミニダーゼ治療の前後で分離されたウイルスの調査によって、一例において治療開始後に分離されたウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性が低下していたことから、阻害剤治療によって患者の体内で耐性ウイルスが出現することが確認された。治療による耐性株出現の頻度をさらに精査するには、治療経過の長引いた患者からの検体をより多く解析することが必要であろう。

平成19年度に行われた家族間感染例の検討では、耐性ウイルスの出現は認められなかった。家族間感染に要した日数が短い例が多いことから、初発患者に対するノイラミニダーゼ阻害剤治療開始時にはすでに、家族内感染が起こっていた可能性があることから、こちらもより多くの症例からの解析が必要であろう。

E. 結論

平成17年度の解析によりノイラミニダーゼ治療歴のない患者からノイラミニダーゼ阻害剤耐性株が検出された。平成18,19年度の解析では、治療歴のある患者一名からの耐性株の分離が確認された。ノイラミニダーゼ阻害剤に対する抵抗性株の出現頻度や出現機序の解明にはより多くの検体の解析が重要になると考えられる。

F. 健康危機情報

特記事項無し。

G. 研究発表

学会発表

Mutations in non-conserved residues outside the neuraminidase active site can confer resistance to influenza neuraminidase inhibitors

J.L. McKimm-Breschkin, K. Jachno, T. Saito, M. Tashiro
13th International Negative Strand Virus, 2006年6月17-22日
サラマンカ スペイン

Mutations in non-conserved residues outside the neuraminidase active site can confer resistance to the influenza neuraminidase inhibitors

J.L. McKimm-Breschkin, K. Jachno, T. Saito and M. Tashiro
Options for the control of influenza VI 2007年6月17-23日
トロント カナダ

平成 17-19 年度厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

「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」

分担研究者 教授 押谷仁 東北大学医学系研究科 微生物学分野
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
東北大学医学系研究科 微生物学分野

H18 年度研究要旨

研究 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。
研究 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。

H19 年度研究要旨

研究 3) では、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。インフルエンザのウイルス学的検討として、研究 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。研究 5) では、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。

研究 1. インフルエンザの Personal Protection に関する Evidence

インフルエンザの Personal Protection に関し、CDC の David Bell と WHO がまとめた総説をもとに、他の文献等を参考しレビューを行った。

1-1. 公共の場でのマスクの使用

公共の場でのマスクの使用がインフルエンザ感染を防ぐというはっきりとした Evidence はない。実際に過去のパンデミックにおいてはマスクの使用が広く推奨されてきたという事実があるが、Retrospective questionnaire survey であることや、マスクをしていた人は他の対策を行っていた可能性もあり、マスクの効果については、はっきりとした結論は得られていない。N95 マスクやサージカルマスクがあるが、どのマスクを使用すべきか考えた場合、インフルエンザウイルスの感染経路が問題、すなわちインフルエンザウイルスが空気感染をするのかどうか問題になる。空現在も空気感染があると主張する立場と、空気感染はないかあっても非常に稀だとする意見がある。各国のパンデミックガイドラインの中でも公共の場でのマスクの使用に対する立場は大きく分かれている。

1-2. 手洗い

手洗いについても、インフルエンザウイルスを

対象としてその効果を正しく検証した論文はこれまでない。Evidence として存在するのは手洗いによって急性呼吸器感染や肺炎の Incidence を有意に減らすというものであり、インフルエンザに対する効果を評価したものではない。そもそもインフルエンザウイルスは手指では 5 分程度しか生存しないというデータもあり、日常生活の中での手洗いがどの程度効果があるかについては疑問の余地もある。

1-3. うがい

ほとんどの国で、うがいは季節性インフルエンザとパンデミックインフルエンザのいずれに対しても推奨されておらず、うがいに対する研究は日本以外ではほとんど行われていない。うがいによって急性呼吸器感染の Incidence が下がったとするデータはあるが、ウイルス学的な検索などを行っていないためにインフルエンザに対する効果は不明である。これに関連する研究としてはお茶の中に含まれるカテキンによるうがいがインフルエンザに対し有効だとするデータがあるが、カテキンの評価が中心であり、うがいそのものの効果を評価しているわけではない。

1-4. 結論

通常行っているインフルエンザ対策において基

本的なエビデンスが少ないことより、これらを裏付けるような検証が今後必要であると考えられる。

研究2. 早期封じ込めと Mitigation Strategy

インフルエンザ対策として、「封じ込め」と「Mitigating strategy」が挙げられる。前者がウイルスを完全に根絶やしにすることを目的とするのに対し、後者は被害を最小限に抑えることを目的とする。

2-1 「早期封じ込め」

「早期封じ込め」感染モデル

早期封じ込めを考える上での基本となる論文が、2005年に発表された。これらは、2005年の時点での鳥インフルエンザ H5N1 の状況を前提（人での感染が東南アジアに局限）として、早期封じ込めの可能性について検討している。早期封じ込めが成功するためには、 R_0 が中程度の状況、1ヶ所のみ、もしくはその周囲の数ヶ所でのみヒト-ヒト感染を起こすウイルスが出現することを前提としている。しかし、実際には別々の場所で同時に出現する場合もあることが指摘されており、この場合も早期封じ込めは成功しない可能性が高い。

日本国内での対応

日本で早期封じ込めが成功する条件としては、まず日本が最初のヒト-ヒト感染の発生国となることであるが、現時点のトリインフルエンザの発生状況からは考えにくい。一方、他国から最初の感染者が流入した場合、それ以降の感染者の流入をほぼ完全に抑え、かつ感染性が想定よりもかなり低い条件の場合のみ、早期封じ込めは可能である。

国境封鎖に近いような対策を日本で行うことが難しいとなると、日本で早期封じ込めを目的とした対策をとることは不可能となる。現在の日本での抗ウイルス薬の備蓄は治療への使用が主目的であるため、これを封じ込めに転用した場合国民の理解が得られるか、これまでの政府・都道府県の説明と矛盾しないかといった問題が考えられる。また封じ込めには国の備蓄を使うのか、都道府県の備蓄を使うのかということも決めておく必要がある。さらに備蓄をどの程度まで封じ込めに使うのかということも問題となる。症例数が増えても封じ込めを目的とした対策を行うとなると、現在保有している備蓄を全部使っても足りなくなる可能性もあり、治療用には残らないことになる。

2-2. Mitigating Strategy

Mitigating strategy は被害を最小限に抑えることを目的とする。その具体的な目的は次のよう

に分類できる。流行のピークを遅らせることによりワクチン生産などのための“時間稼ぎ”が可能となる。流行の規模を小さくすることにより、全体の感染者数を抑えるとともにピーク時の医療・社会機能等の破綻を防ぐ。また、なるべくならかなピークとなるようにすることにより、全体の感染者数は同じでもピークが小さくなる分、医療・社会機能等の破綻を防げる。

Mitigating Strategy の具体的な対策

Mitigating Strategy の具体的な対策として、「国境での水際作戦」と Targeted Antiviral Prophylaxis (TAP) がある。国境での“水際作戦”により、ウイルス流入の時期を遅らせることにより流行のピークを遅らせることが可能となるが、国境封鎖に近い対策をしないと実際の効果はほとんどないことが疫学モデルでは示されている。一方の、Targeted Antiviral Prophylaxis (TAP) は、感染が確認された患者の濃厚接触者あるいは接触する機会があったと考えられる人に対して抗ウイルス薬の予防投与を行う方法である。Mitigating Strategy におけるワクチンは、Pre-pandemic vaccine と Post-pandemic vaccine に分けて考える。前者は、パンデミックを起こす可能性の高いウイルス亜型（現時点では H5N1 がこれにあたる）に対するワクチンをパンデミックが始まる前に作成しておいたものである。実際のパンデミック株の抗原性がワクチン株と異なる可能性があり、その場合は有効性が低くなる。後者は、パンデミックが始まってから生産されるワクチンである。パンデミック株が急速に抗原性を変化させない限り、ワクチン株の抗原性はパンデミック株と一致する。しかし、最大の欠点として、パンデミックが始まってからワクチンの生産をするため、数ヶ月のタイムラグが生じてしまうことである。

Mitigating Strategy の中で考えられている対策の有効性

基本的には単一の対策では十分な有効性が期待できず、いくつかの対策を組み合わせる必要がある。特に抗ウイルス薬もしくはワクチンは、有効性を確保するために必須である。しかし相当量の抗ウイルス薬を予防投与に使う必要がでて

くる。現行の日本の備蓄から予防投与に相当量を回すことが可能かどうかの問題はある。これまでの専門家会議の議論のなかでも Early containment（早期封じ込め）と Mitigating Strategy についての区別がはっきりしていない。

日本でも TAP などの Mitigating Strategy は当然行われるべきだと考えるが、早期封じ込めを行うべきかどうかということに関してはさらに議論が必要だと考える。

研究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」

【背景】

現状において、我々はインフルエンザの大流行に対してワクチンや抗ウイルス剤を使用しない「非薬物的対策 (non-pharmaceutical intervention) に頼らざるを得ない部分がある。しかし、こういった対策は世間一般に推奨されているものの、その多くは科学的なエビデンスの明らかでないものが多い。そこでこの研究では、過去に発表されたさまざまな論文などの文献を検索し、個々の非薬物的対策を評価するためのエビデンスの有無について調査した。

【対象と方法】

医学論文のデータベースである Pubmed にて、“influenza pandemic intervention(s)” “influenza non(-) pharmaceutical”, および “influenza mitigation” のキーワードを検索に用いた。

【結果および考察】

各キーワードによる検索では、“influenza pandemic intervention” 76 件、“influenza pandemic Interventions” 89 件、“influenza non-pharmaceutical” 5 件、“influenza non-pharmaceutical” 8 件、“influenza mitigation” 15 件の文献が該当した。これらの論文の内容を検討した結果、非薬物的対策として「旅行制限」「患者、暴露者の隔離」「学校閉鎖」「マスク」「咳エチケット」「手洗い」が主なものとして考えられたため、これらをキーワードとして再び検索を行った。内容を吟味した結果、229 件の文献が今回の研究対象として採用された。

最終的に研究の対象となった文献をもとに非薬物的対策を分類すると「地域の閉鎖 (close area)」、「旅行制限 (travel restriction)」、「水際スクリーニング (screening at borders)」、「患者、暴露者の隔離 (isolation, quarantine)」、「社会的に接触を減らす (学校閉鎖以外) (social distance (expect for school

closure))」、「学校閉鎖 (school closure)」、「マスク (mask)」、「咳エチケット (respiratory etiquette)」、「衛生対策 (手指衛生以外) (hygiene (expect for hand hygiene))」、「手指衛生 (hand hygiene)」、「一般大衆への情報の普及、教育 (education and information for the public)」、「医療機関の準備・対策 (preparedness and taking measures for flu in hospitals)」、「サーベイランス (surveillance)」、「ガイドラインの策定 (guideline)」、「国際的な協力 (international collaboration)」、「その他 (others)」に分けられた(表1)。

【まとめ】

EBM(Evidence Based-Medicine)において、エビデンスとしてのレベルはシステマティックレビュー/メタアナリシス、無作為割り付け比較試験、分析疫学的研究、記述研究(ケースレポート)、専門家の意見、の順に低くなるとされている。今回調べられた論文の大多数は専門家の意見によって書かれたもの (expert opinion, non-systematic review(expert opinion)) であり、エビデンスとしてレベルが高いとされるシステマティックレビュー/メタアナリシス、無作為割り付け比較試験はほとんど見受けられなかった。その理由としてはインフルエンザの流行に際して、一般に行うことが推奨されているような非薬物的対策(手洗いなど)を行う群と行わない群に割り付けることが現実的に(倫理的にも)困難であるだと考えられる。一方、レベルは下がるものの、症例対照研究を行い、対照に比して症例が有意に行っていなかった対策があれば、それが有効性を示す疫学的なエビデンスとして考えることは可能である。

研究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—」

【背景】

東南アジアのフィリピンと日本（仙台および福岡）におけるインフルエンザウイルス A (H3) の抗原性およびアマンタジン耐性能の有無について調査を行い、異なる地域におけるインフルエンザウイルスの抗原決定部位および薬剤耐性遺伝子の変異について観察した。

【方法】

フィリピンにおけるインフルエンザサーベイランスにて採取された検体および仙台市内および福岡市内の開業医より提出された検体より、MDCK 細胞を用いたウイルス分離を行った。インフルエンザウイルス分離の確認は、赤血球凝集阻止試験を用いた。系統樹解析として、抗原性決定領域である HA1 部位のシーケンスを行った。アマンタジン耐性能については、M2 膜貫通領域のシーケンスにてスクリーニングを行い、TCID50 を用いた薬剤耐性試験にて確認した。

【結果】

2006—2007 年に、フィリピンで分離された 86 株、仙台および福岡の検体からの 67 株（仙台 44 株、福岡市内 23 株）を用いて、系統樹解析を行った。フィリピン分離株のみによる系統樹解析では、2006 年の分離株が中心になっているクレードと、2006 年後半から 2007 年に分離された株が中心になっている 2 つのクレードが存在した。このクレードの分岐は、M2 領域のアマンタジン耐性スクリーニングの結果と一致しており、後者のクレードはアマンタジン耐性株が 7 株（15.2%）であった。日本の分離株も二つのクレードを形成し、

その分岐はアマンタジンの耐性と一致し、仙台では 39 株（88%）福岡では（54%）が耐性株であった。しかし、二つの地域のデータを合わせると、フィリピン分離株すべてが日本国内のアマンタジン耐性株と同じクレードに入った（図 1）。

【考察】

インフルエンザ罹患者にアマンタジンが処方されることがほとんどないフィリピンにおいても、アマンタジン耐性ウイルスを確認したが、その頻度は日本国内のものより低かった。培養液中にアマンタジンを添加により耐性ウイルスが出現することより、抗ウイルス薬への暴露がある程度関与していると考えられるが、フィリピンのような国では説明がつかない。それぞれの地域で分離されたウイルスのみを対象に系統樹解析を行うと M2 領域の変異と一致して耐性および感受性に分かれていたが、二つの地域のデータを合わせると日本国内の耐性ウイルスにまぎれるようにフィリピンの感受性ウイルスが入っていた。この現象は、一つの薬剤耐性ウイルスが世界各国に広まったのではなく、ウイルスが地域で伝播している間に耐性能を獲得したと考えられる。また、この結果は、HA 遺伝子と M 遺伝子が並行して変異していない事も示している。この変異が reassortment によるものかについては、他の分節遺伝子の塩基配列の確認が必要になっている。フィリピンで検出された薬剤耐性株は研究期間の終わりに収束しており、今後これらの薬剤耐性ウイルスがフィリピン国内でどのように広まっていったのか検討が必要である。

5 「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」

【背景】

トリインフルエンザウイルス (H5N1) のヒト感染症例にのいて注目すべき点として、トリインフルエンザウイルスが罹患者の気道分泌物のみならず、便や血中からも分離・検出されたとする報告である。これは、ヒトが免疫を持っていない新型インフルエンザに罹患した際、患者の気道内分泌物以外に便からも感染しうることを示唆しており、ウイルス学、感染予防・防御および公衆衛生の観点においても非常に重要な発見である。一方 Wootton 等は、通常のヒトインフルエンザに罹患した小児の便中からインフルエンザウイルスを PCR にて検出している。小児の免疫能が十分に発達しておらず、ワクチンの効果も低く、イン

フルエンザウイルスへの免疫が未熟である点は、ヒトが新型インフルエンザウイルスに対して免疫がない点と類似しており、小児における便中へのウイルスの排泄は新型インフルエンザ感染のモデルに近いと考えられる。そこで我々は、インフルエンザに対して免疫を十分持っていないと予想される小児インフルエンザ患者の気道分泌物および便中から既存のインフルエンザウイルスを検出し、1) 検体中のウイルス量の経時的な変化、2) ウイルス抗原性とウイルスの排泄の関連について、3) 臨床像とウイルス排泄量などについて観察し、ヒトが新型インフルエンザウイルスに感染した際のウイルス排泄方法について類推できると考えている。