

200808009A

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保
に関する研究

平成20年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 小田切孝人

平成21(2009)年3月

目 次

- I. 総括研究年度終了報告
新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究
研究代表者：小田切孝人 _____ P2
- II. 分担研究年度終了報告
1. 新型インフルエンザ用ワクチンの品質に対する国際基準に関する研究
田代真人 _____ P8
2. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究
河岡義裕 _____ P23
3. 新型インフルエンザ用ワクチン製造用 LLC-MK2 細胞株の有用性に関する研究 (III)
影山努 _____ P25
協力研究者：白倉雅之、岸田典子
4. 新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討
原田勇一 _____ P 32
5. ワクチン有効性評価技術の開発
高橋宜聖 _____ P35
協力研究者：小野寺大志、小林和夫、小田切孝人、田代真人
6. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究
長谷川秀樹 _____ P 40
協力研究者：相内章、田村慎一
7. 新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究
神谷齊 _____ P47
協力研究者：中野 貴司、庵原俊昭、木下麻衣子、高橋裕明
矢野拓也、大熊和行、松田正、鳥越貞義、二井立恵、
伊佐地真知子、渡辺正博、落合仁、梅本正和、
安田尚樹、酒徳浩之、羽根靖之、加藤孝
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P87
- IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業）
総括研究年度終了報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

研究代表者 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

研究要旨

2003年末から日本を含む東アジア諸国の家禽で発生した高病原性H5N1鳥インフルエンザの流行は、地球規模で拡大し、東南アジア地域の鳥では定着している。ヒトへの感染例も依然として増え続けており、いずれヒト型に変異して新型インフルエンザウイルスとなりパンデミックを引き起こすことが危惧される。このため、新型インフルエンザウイルスが出現する前に安全で抗原性のマッチした新型ワクチンの実用化と供給体制を一刻も早く完成し、技術改良および安全性・品質管理に関する国際基準を策定することが重要である。わが国の新型インフルエンザワクチン開発は、海外のWHO協力機関から弱毒化ワクチン株を入手し、各年度毎に1000万人分ずつH5N1ワクチンを製造し、国家備蓄している。一方、パンデミック期では、市中流行株を採用したワクチンを速やかに製造する必要がある。そのために、わが国でも独自にヒト用新型ワクチン株の供給ができるシステムを確立し、その実用化が必須である。

本研究の最大の成果は、新型ワクチン製造と実用化の上で最大の障害となっていたリバースジェネティクス(RG)法に用いる安全で品質が検証された細胞株(LLC-MK2D細胞)の樹立に成功したことである。これにより、わが国でも海外協力機関に依存することなく独自にヒト用ワクチン株を製造できるようになった。本年度の研究では、これをさらに強化するために、これまで採用していたRG法の改良を行い、新たに弱毒化H5N1試作ワクチン株を追加したワクチン株バンクを充実させた。ワクチン株作製における安全性・品質管理に関する国際基準の策定に参画し、今年度の参照ワクチン株選定を実施した。さらに、新型インフルエンザはH5N1ウイルスで起こるとは限らないことから、H6、H7、H9など他の亜型ウイルスを用いたワクチン製造も検討した。LLC-MK2D細胞株によるこれらウイルスの増殖効率をVero細胞、MDCK細胞と比較検討し、良好な成績を得た。また、昨年度に国家備蓄ワクチンに採用されたクレード2.3.4に属するA/安徽株ワクチンについて、交叉免疫・感染防御効果をマウスモデルで検討し、広い交叉免疫効果があることを実証した。また、ELISAを用いたその評価法を新規に構築した。一方、経鼻粘膜ワクチンの実用化の一環として、新規にキノコ抽出物をアジュバントとした経鼻ワクチンの効果をマウスで検討した。さらに、小児での新型ワクチンの接種量の設定に必要な基礎データを収集するために、現行の季節性ワクチンで異なる接種量による小児の免疫応答および副反応について検討し、新型ワクチンの小児への接種量策定への有用な情報を得た。

研究組織		河岡義裕	東京大学医科学研究所
研究代表者			教授
小田切孝人	国立感染症研究所 ウイルス第3部室長	影山努	国立感染症研究所 ウイルス第3部研究員
研究分担者		原田勇一	国立感染症研究所
田代真人	国立感染症研究所 ウイルス第3部部长	高橋宜聖	国立感染症研究所

長谷川秀樹 免疫部主任研究官
国立感染症研究所
感染病理部室長
神谷齊 (独)国立病院機構
三重病院名誉院長

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザ(H5N1-HPAI)の家禽および野鳥での流行は、5年が経過した現在では地球規模に広がり、制圧は不可能となっている。ヒトへの感染も依然として繰り返して起こっており、これに起因した新型インフルエンザウイルスによる世界的な大流行の可能性が高まっている。従って、わが国を含む多くの国では新型インフルエンザ対策を国家最重要課題と位置づけ、種々の対応準備を進めている。

新型インフルエンザ対策の根幹を成すのは、安全かつ有効なワクチン開発と供給体制の確保である。このために、高病原性流行株からRG法で弱毒化H5N1ワクチン候補株を開発し、ヒト用のH5N1ワクチン製造株の供給が必要である。これまでの本研究では、RG法に用いる品質と安全性の検証された培養細胞株LLC-MK2D細胞をGMP施設において樹立したことから、わが国独自でヒト用のワクチン製造株を開発できるようになった。これは、本研究班における最大の成果である。また、国立感染症研究所(感染研)にGMP準拠のワクチン株製造施設が完成したことから、国内外のワクチン製造所へ品質と安全性の検証されたワクチン種ウイルスの供給が可能となった。

本年度の研究においては、新型インフルエンザワクチンを安全に供給するために、これまで行ってきた基礎研究をさらに拡張し、より充実した情報を供給することを目的とした。

B. 研究方法

1. H5N1ワクチン株の選定と性状解析および評価。

H5N1ウイルスの遺伝子解析、抗原解析から、さらにプレパデミックワクチンの

準備を必要とするウイルスを選択し、リバースジェネティクス法で作製した。これらの弱毒化ワクチン製造株について、遺伝子および抗原性に関する性状を解析した。

2. 製造効率の良いワクチン株の作製。
HA、NAをA/Vietnam/1194/04(VN1194, H5N1)由来、あるいはA/Vietnam/1203/04(VN1203, H5N1)由来としたワクチンシードウイルスのPR8/H5N1 6:2 reassortant (PR8/VN1194/あるいはPR8/VN1203)を作製した。HA/NAバランスを決定するために、他のウイルス(PR8, A/WSN/33, A/Kanagawa/173/03, A/Hong Kong/213/03)由来のN1NAやVN1203由来NAのストーク領域を長くしたNA(VN1203Fill)と置き換えて6:1:1 reassortantを作製し、PR8/VN1194あるいはPR8/VN1203と比較検討した。

3. GMP-LLCMK2細胞によるウイルス増殖性の検討。

A/H5, A/H6, A/H7あるいはA/H9亜型株の2種類(HA, NA)の遺伝子と高増殖性標準株(A/PR/8/34)株の6種類(PB1, PB2, PA, NP, M, NS)の遺伝子のvRNA合成プラスミドと4種類(PB1, PB2, PA, NP)のタンパク質発現プラスミドをLLC-MK2細胞またはVero細胞にFuGENE HD Transfection Reagent(Roche)を用いてトランスフェクションしたRG法で組み換えウイルスを作製した。それらの増殖能をLLC-MK2細胞、Vero細胞およびMDCK細胞で比較検討した。

4. クレード2, 3, 4ワクチン株A/Anhui-RGのワクチン効果の検討。

A/Anhui-RG弱毒化ワクチン株にAlum添加したホルマリン不活化全粒子ワクチンを作製した。BALB/cマウスへの皮下接種により得られる免疫効果を中和抗体価測定および異なるクレードのH5N1野生株の攻撃感染により評価した。

5. A/Anhui-RG弱毒化ワクチン株に対するEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系の構築。

A/Anhui株のHAタンパクをバキュロウイルス発現系を用いて作製した。これを用いたELISA

系で測定した抗体価をHI及び中和抗体価と比較検討した。

6. A/VN/1194/2004 (H5N1)由来の弱毒化ワクチン株 NIBRG14 と4種のきのこの熱性抽出物を用いた。 *Phellinus linteus*, *Macrolepiota gracilentia*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes* をアジュバントとした不活化ワクチンを作製した。これらの免疫効果をELISA法で評価した。

7. 2007/08シーズンの国産ワクチン (A/Solomon Islands/3/2006, A/Hiroshima/52/2005, B/Malaysia/2506/2004) およびサノフィパスツール社製ワクチン (A/Solomon Islands/3/2006, A/Wisconsin/67/2005, B/Malaysia/2506/2004) を用いて、3歳未満0.25mL, 3歳以上0.5mLの接種量における抗体誘導能、臨床症状について検討した。

C. 結果と考察

1 H5N1 ワクチン株の選定と評価。

現在世界各国で流行中のH5N1鳥インフルエンザウイルスについて遺伝子解析および抗原解析を行った結果、新たにワクチン候補として検討すべきクレードのウイルスを特定した。これらについて、リバースジェネティクス法により弱毒型ワクチン製造株を作成した。このウイルス株について、全塩基配列および抗原解析を行い、先の基準に照らして、元のウイルス株と完全に一致していることを確認した。

2 製造効率の良いワクチン株の作製。

プラークサイズによる検討では、ストーク領域が長い A/Hong Kong/213/03 由来の NA および VN1203FillNA をもった 6:1:1 reassortant のプラークサイズが PR8/VN1194 あるいは PR8/VN1203 よりも有意に大きかった。またウイルス力価も有意に高かった。H5N1 ワクチンシードウイルスの MDCK 細胞での増殖性は、HA/NA 機能バランスを変えることで向

上可能であることがわかった。

3 ワクチン製造用としての GMP-LLCMK2 細胞の有用性の検討。

RG 法に H5, H6, H7, H9 亜型ウイルスを作製し、ウイルス増殖能を GMP-LLCMK2 細胞、Vero 細胞、MDCK 細胞とで比較した。その結果、A/H5 亜型株リアソータントウイルスでは、24 時間の培養では、MDCK 細胞に比べると LLC-MK2 細胞および Vero 細胞での増殖は悪かったが、48 時間の培養では、いずれの細胞でも非常に良く増殖していた。一方、A/H7 亜型株リアソータントウイルスでは、MDCK 細胞でよく増殖していたが、Vero 細胞、LLC-MK2 細胞では 48 時間の培養でもほとんど増殖しなかった。さらに 72 時間の培養でも Vero 細胞ではほとんど増殖せず、LLC-MK2 細胞でも MDCK 細胞の約 1/100 しか感染性のあるウイルスが増殖しなかった。

さらに、これら細胞で数代継代したウイルスの遺伝的安定性を検討した。その結果、MDCK 細胞で 10^6 倍希釈して継代、LLC-MK2 細胞では 10^4 倍希釈して継代した場合、6 代目では HA 遺伝子の変異は見られなかった。一方、MDCK 細胞で 10^8 倍希釈して継代した場合、4 代目以降でアミノ酸置換を伴う変異が 1 カ所、LLC-MK2 細胞では 10^5 倍希釈して継代した場合、6 代目でアミノ酸置換を伴わない遺伝子変異が 1 カ所確認された。

4 マウスにおけるクレード 2.3.4-H5N1 ワクチンの有効性の評価。

A/Anhui ワクチン接種マウス血中のウイルス中和抗体価を測定したところ、これらの血中抗体は clade の異なるウイルスに広く交叉反応した。また、強毒ウイルスによる攻撃試験を行った結果、攻撃試験に用いた強毒ウイルスの clade にかかわらず、ワクチン接種を施したマウスは全例生残した。このことから、clade 2.3.4 に属する A/Anhui-PR8-IBCDC-RG5 株由来不活化全粒子ワクチンは、マウス血中に幅広い clade のウイルスに対する中和抗体を誘導することができ、その後の攻撃試験においても、

用いた全ての clade のウイルスに対してマウスに効果的な感染防御をもたらせることが明らかとなった。

5 クレード 2.3.4-A/Anhui 株ワクチンにより誘導される抗体価の比較。

RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体の HI 活性と中和活性を他のワクチン株と比較するため、HI 抗体価と中和抗体価を測定し、抗 HA IgG 抗体価に対する比率を計算した。

RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体の HI 活性は、NIBRG-14 ワクチンと比較し 5 倍増加しているものの、依然として H1N1 ワクチンより有意に低いことが判明した。中和活性も H1N1 ワクチンに比べ低いことが明らかとなった。このことから、RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体は、NIBRG-14 ワクチンと同様に HI 活性、中和活性ともに低いことが明らかとなった。これに対し、RG-Indonesia/5 ワクチンが誘導する抗体は、中和活性が他の H5N1 ワクチンに比べ有意に高く、H1N1 ワクチンの約 50% の値を示すことが判明した。

6 天然物由良のキノコ菌糸体抽出物をアジュバントとした経鼻接種ワクチンのインフルエンザ感染防御効果の検討。

キノコ熱性抽出物の *Phellinus linteus* (PL) をアジュバントとした全粒子不活化ワクチン NIBRG 14 ワクチンを経鼻接種しその後相同株である A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 及び非相同株である A/Hong Kong/483/97 (H5N1)、A/Indonesia/6/2005 (H5N1) インフルエンザウイルスで攻撃感染を行った。NIBRG14 に対する鼻腔洗浄液中の IgA 抗体や血清中の IgG 抗体価は PL アジュバントを用いない群や非免疫群と比較して有意に高かった。A/Vietnam/1194/2004 での攻撃感染に対し、PL アジュバント併用ワクチン接種群では対照群と比較し有意にウイルス価を減少させた。

一方、PL アジュバントを用いた群ではイ

ンターフェロン γ 産生が見られなかった。これらの結果からキノコ熱性抽出物アジュバントを用いたインフルエンザワクチンの経鼻接種では特異的 T 細胞応答は比較的低いものと考えられる。

8 小児におけるインフルエンザ HA ワクチンの接種量と免疫応答に関する検討。

接種前と 2 回接種後の抗体価を見た。0.25mL の 2 回目接種後の平均抗体価を国産ワクチン、海外ワクチンで比較したところ、A/H1, A/H3 とも海外ワクチンが高い抗体価を誘導した。一方、0.50mL 接種では両者に優位の差は見られなかった。B 型ワクチンについては、いずれのワクチンとも良好な上昇傾向は認められず、接種量でも大きな差は認められなかった。

D 結論

- 流行中の H5N1 ウイルスの性状を解析し、新たなワクチン製造株を作製して、昨年度に作成した WHO の基準に照らした、その安全性に関する基盤を検証した。
- NA 蛋白のストック領域に欠損を持つ現行の H5N1 流行株をストックの長い NA 蛋白で置き換えると、MDCK 細胞で増殖性の高いワクチンウイルスとなる。
- ヒト用ワクチン株作製の細胞株 GMP-LLCMK2 細胞では、H5 亜型のみならず、H6, H7, H9 亜型インフルエンザワクチンを効率よく作製できる。
- Clade 2.3.4 の A/Anhui ワクチン株は、他のクレードの H5N1 ウイルスに対して、広い交叉免疫性を示す。
- Clade 2.3.4 の A/Anhui ワクチンの抗体検出系と評価系を新たに構築できた。
- キノコ由来熱性抽出物 *Phellinus linteus* は H5N1 経鼻接種ワクチンのアジュバントとして有用であることが示唆された。
- 小児に対する 0.25mL の接種量での A/H1 及び A/H3 亜型インフルエンザに対する免

疫応答は、海外ワクチンの方が国産ワクチンよりも高い。しかし、0.5mL では差が無く、またB型インフルエンザに対してはいずれも低かった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

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

H Kamijuku, Y Nagata, X Jiang, T Ichinohe, T Tashiro, K Mori, M Taniguchi, K Hase, H Ohno, T Shimaoka, S Yonehara, T Odagiri, M Tashiro, T Sata, H Hasegawa and K-i Seino. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alfa-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 1, 208-218 (2008).

Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):340-6.

Keiichi Makizumi, Kazuhiko Kimachi, Katsuhiko Fukada, Tomohiro Nishimura, Yasuhiro Kudo, Shuro Goto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoichiro Kino Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003-2004 epidemic strain may have been possible using Madin-Darby canine kidney cells. *Vaccine*, 26, 6852-6858, 2008

2. 学会発表

Takato Odagiri Antiviral resistance surveillance of influenza viruses in Japan. Workshop on antiviral resistance monitoring, The 2nd Meeting of National Influenza Centers in the Western Pacific and South East Asia Regions, Tokyo, Japan, 21-24 April 2008.

Takato Odagiri Influenza surveillance in Japan. The 2nd Meeting of National Influenza Centers in the Western Pacific and South East Asia Regions, Tokyo, Japan, 21-24 April 2008.

長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御 第56回日本ウイルス学会、岡山、10月(2008)

池野大介、来海和彦、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎 BALB/cマウスを用いたパンデミックワクチン投与法の検討 第56回日本ウイルス学会、岡山、10月(2008)

氏家誠、小淵正次、影山努、白倉雅之、岸田典子、島袋梢、望月菊、堀川博司、加藤裕美子、山田隆一、藤田信之、田代真人、小田切孝人 2007/08 シーズンに分離された H275Y マーカーをもつインフルエンザウイルス A/H1N1 オセルタミビル耐性株の国内発生状況 第56回日本ウイルス学会、岡山、10月(2008)

川上千春、小淵正次、氏家誠、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代真人 横浜市におけるオセルタミビル耐性 A/H1N1 型インフルエンザウイルスの解析 第56回日本ウイルス学会、岡山、10月(2008)

小淵正次、氏家誠、板村繁之、影山努、白倉雅之、原田勇一、岸田典子、堀川博司、加藤裕美子、細山哲、原田健史、矢代勲、山田隆一、藤田信之、小田切孝人、田代真人 2007/08 シーズンのインフルエンザ流行株と平成20年度のワクチン株 第56回日本ウイルス学会、岡山、10月(2008)

牧角啓一、来海和彦、深田勝彦、西村知裕、工藤康宏、後藤修郎、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎 ワクチン製造用無血清培地浮遊培

養 MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性および性状解析 第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月(2008)

岸田典子、影山努、白倉雅之、今井正樹、中村雅子、石崎徹、山岡政興、押部智宏、稲元哲朗、島津幸枝、千々和勝巳、小田切孝人 国内に飛来する野生水禽が保有する鳥インフルエンザウイルスの調査 第 56 回日本ウイルス学会、岡山、10 月(2008)

高橋宣聖、阿戸学、二宮愛、長谷川秀樹、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人、小林和夫 H5NI(NIBRG-14)ワクチンの感染防御効果には、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が関与する 第 12 回日本ワクチン学会、熊本、11 月(2008)

河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人、多田善一、城野洋一郎、池田富夫、五反田亨 新型インフルエンザワクチンの効果判定の指標としての抗体価測定法(HI 試験及び中和試験)の再現性と感度の比較 第 12 回日本ワクチン学会、熊本、11 月(2008)

長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典子、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討 第 12 回日本ワクチン学会、熊本、11 月(2008)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準に関する研究

研究分担者 田代 真人 国立感染症研究所 ウイルス第3部長

東アジアからアフリカまで広く流行している H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、ヒト型ウイルスに変異して、新型インフルエンザとして人の間で大流行して、大きな健康被害と社会経済的な影響をもたらす可能性が危惧されている。新型インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、リバーズジェネティクス技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。WHO の勧告に基づいて、我が国をはじめとして世界各国において、この技術を駆使した新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。その一方で、世界各地に供給される新型ワクチンに関しては、その品質、規格に関する国際的な基準を作成する必要がある。そこで WHO と協力して、新型インフルエンザワクチンの品質規格と国際基準の作成を行ってきた。

本年度は、このような背景をもとに、WHO 世界インフルエンザ監視ネットワーク (GISN) において、現在流行中の H5N1 ウイルス株のうちで、ワクチン株として開発すべきものを選択し、その評価を行った。

A. 研究目的

東アジアからアフリカまで広く流行している H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、ヒト型ウイルスに変異して、新型インフルエンザとして人の間で大流行して、大きな健康被害と社会経済的な影響をもたらす可能性が危惧されている。

高病原性鳥インフルエンザに対するワクチン製造株の開発においては、高病原性ウイルスをそのままワクチン製造に用いることは、万一従業員が感染を受けた際の危険性があり、また発育鶏卵が早期に死んでしまうためにウイルス増殖量が少なく、製造効率が極端に悪いことから、適当ではない。従って、ワクチン製造には、弱毒型もしくは弱毒化したウイルス株を使用する必要である。

最近、このような諸問題を解決し、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術 (リバーズ・ジェネティクス) が開発された。これを用いれば、任意の感染性ウイルスを作製することが可能である。

最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されている H5N1 型高病原性鳥インフルエンザに対しては、

2004 年に WHO はワクチン製造株の緊急開発を指示した。その実施に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化することが最短かつ確実な選択肢である。しかし、この新技術の応用においては、世界的にも管理規定や指針は無かった。そこで、WHO 世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセーフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。また、WHO 世界インフルエンザ計画のメンバーとして、「WHO 鳥インフルエンザウイルスに由来する遺伝子再集合不活化インフルエンザワクチンの試験製造におけるバイオセーフティーに関するリスク評価基準」をまとめたが、平成 18 年度はこれらの基準に沿って、現在開発中の H5N1 型試験ワクチンの製造株について、リスク評価を行った。

この間に、我が国でも、リバーズジェネティクスで弱毒化したウイルス株を用いて、発育鶏卵増殖・ホルマリン不活化・アルミアジュバント添加・全粒子の H5N1 型ワクチンが試作され、非臨床試験、第 1 相および第 2 + 3 相臨床試験が行

われて、安全性と有効性において十分に評価に耐える成績が得られている。その結果、2007年秋にはH5N1新型インフルエンザワクチンの製造承認が得られ、プレパンデミックワクチンの国家備蓄が進んでいる。特に、プレパンデミックワクチンの事前接種においては、安全性試験を十分に行っておくことが必要であり、また時間的にも可能である。

その一方で、世界各地に供給される新型ワクチンに関しては、その品質、規格に関する国際的な基準を作成する必要がある。そこで、平成19年度には、WHOと協力して、新型インフルエンザワクチンの品質規格と国際基準の作成を行った。更に各国の品質管理機関およびワクチン製造業者からの意見を採り入れて改訂を進めた。

これらの基盤に立って、WHO世界インフルエンザ監視ネットワークの一員として、現在流行中のH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスについて、新たなワクチン株の開発が必要なウイルスを選定し、その標準ワクチン株の性状を解析した。

B. 研究方法

これまで経験、蓄積されてきたリバース・ジェネティクスに関する技術的な問題点、遺伝子組換え操作・遺伝子組換え医薬品としての位置づけ、安全性の評価、バイオセフティー管理上の評価と対応、生物学的製剤の原材料製造過程としての位置づけとGMPとの関係等に関する情報、及び国内外における議論を幅広く検討した。さらに、各国の臨床試験成績を詳細に比較検討し、これらの情報から得られた新たな知見の合意事項をまとめるとともに、現在の施設、設備、対応能力を把握し、現実的に緊急に対応する必要性を勘案して、現時点における新型インフルエンザワクチンに対する国際基準最終案を作成した（基準案については、平成19年度の報告書に添付してある。）

本年度は、これに沿って、H5N1ウイルスの遺伝子解析、抗原解析から、さらにプレパンデミックワクチンの準備を必要とするウイルスを選択し、リバースジェネティクス法で作製したこれらの弱毒化ワクチン製造株について、遺伝子および抗原性に関する性状を解析した

C. 研究成果 と D. 考察

現在世界各国で流行中のH5N1鳥インフルエンザウイルスについて遺伝子解析および抗原解析を行った結果、新たにワクチン候補として検討すべきクレードのウイルスを特定した。これらについて、リバースジェネティクス法により弱毒型ワクチン製造株を作成した。このウイルス株について、全塩基配列および抗原解析を行い、先の基準に照らして、元のウイルス株と完全に一致していることを確認した。

*別添：添付文書参考

① Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine viruses developed for potential use in human vaccines
September 2008

② Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines
February 2009

E. 結論

最近、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバース・ジェネティクス）が開発された。最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されているH5N1型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。さらに、免疫原性を高め、必要な抗原量を節約するためのアジュバントの添加が必要であることが示された。そこで、WHO世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめ、それに基づいて、我が国で開発したH5N1型ワクチンの評価を行った。

これらを総合して、我が国で開発したH5N1型アルミアジュバント添加、全粒子ホルマリン不活化ワクチンの安全性、有効性について、十分な評価が得られ、平成19年10月には、2所社に対して製造承認が与えられた。これに基づいて、2000万人分のプレパンデミックワクチン原液が製造され、国家備蓄された。

さらに、その後流行中のH5N1ウイルスの性状を解析し、新たなワクチン製造株を作製して、

昨年度に作成したWHOの基準に照らした、その安全性に関する基盤を検証した。

F. 発表

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 galactosylceramide which can induce cross-protection against influenza viruses.

Mucosal Immunol. 1: 208-218, 2008

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 320: 340-346, 2008

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. 18: 160-166, 2008

Kubota, T., Matuoka, M., Chang, T.-H., Taylor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. J. Biol. Chem. 283: 25660-25670, 2008

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. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses Vaccine 26: 31-34, 2008.

Makizumi, K., Kimachi, K., Fukada, K., Nishimura, T., Kudo Y., Goto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003–2004 epidemic strain may have been possible using Madin–Darby canine kidney cells Vaccine, 26: 6852-6858, 2008

Nicoll, A., Mori, K., Tashiro, M. Winston Churchill and the Russian Pandemic of 1890-91 Br. Med. J. 337: 2890, 2008

Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season. Jpn. J. Infect. Dis. 62: 83-86, 2009

Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M.

Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) - inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. J. Infect. Dis. (2009 in press)

Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. Differences by age in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy. Microbiol. Immunol. (2009 in press)

Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y.

The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model Vaccine (2009 in press)

Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. Development of assay for the detection and quantitation

of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) *J. Med. Microbiol.* (2009 in press)

Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Kato, K., Suzuki, Y. Determination of *N*-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1).

Virology (2009)

Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. PolyI:PolyC₁₂U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* (2009)

Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F.

Surveillance for Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* (2009)

WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group;

Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Other Resp. Viral Infect.* (2009, in press)

Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine viruses developed for potential use in human vaccines

September 2008

It is not known if the next influenza pandemic will be caused by H5N1 viruses or, should one occur, which of the clades of H5N1 viruses would be responsible. However, because an H5N1 pandemic is an important possibility, the development of representative H5N1 candidate vaccine viruses coordinated by the World Health Organization (WHO) is one component of the overall global strategy for pandemic preparedness. This summary provides an update on the characterization of available H5N1 viruses circulating in birds, including those that have caused human infections and the current status of the development of candidate H5N1 vaccine viruses. This information may be used to guide national decisions on procurement of H5N1 vaccines.

H5N1 vaccines continue to be developed by manufacturers using clade 1 and clade 2 viruses. Clinical trials have been conducted or are under way in several countries and stockpiles of clade 1 and clade 2 vaccines are being acquired by a number of countries (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/flu_trials_tables/en/index.html). Clinical trials using different viruses should continue as an essential element in pandemic preparedness and provide data on priming, vaccination schedules, and induction of cross-reactive immunity by vaccines containing viruses from different clades.

Companies are recommended to consult individual national authorities on the specific H5N1 viruses to be used for preparing experimental pilot lots and stockpiles of H5N1 vaccines. Decisions should be based on the epidemiology and geographical distribution of the circulating H5N1 viruses.

Comparisons of the candidate H5N1 vaccine viruses with respect to immunogenicity and cross-reactivity and their relationship to newly emerging H5N1 viruses are ongoing, and will be updated periodically by WHO.

Molecular epidemiology of H5N1 viruses

A revised nomenclature for phylogenetic relationships among the haemagglutinin (HA) genes of H5N1 viruses was devised by consultation among representatives of OIE, FAO and WHO (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html) (Figure 1). The HA sequences of the majority of H5N1 viruses circulating in avian species are separated into a number of distinct clades. Clade 1 viruses have caused human infections in Cambodia, China Hong Kong Special Administrative Region, Thailand and Viet Nam and have been recently detected in poultry in Cambodia, Thailand and Viet Nam. Clade 2.1 viruses have continued to circulate in poultry and caused human infections in Indonesia. Clade 2.2 viruses have the most geographically diverse distribution and have caused outbreaks in birds in over 60 countries in Africa, Asia and Europe with human infections in Azerbaijan, Bangladesh, China, Djibouti, Egypt, Iraq, Nigeria, Pakistan and Turkey. Some recent clade 2.2 viruses have diverged genetically from reference strains. Clade 2.3 viruses are genetically diverse. Clade 2.3.2 and 2.3.4 viruses continue to circulate in birds in Asia; clade 2.3.4 viruses have been responsible for human infections in China, Lao People's Democratic Republic, Myanmar and Viet Nam. Viruses from other clades, including clade 7, have been sporadically detected in birds in Asia.

Antigenic characteristics of H5N1 viruses

Haemagglutination inhibition tests of available H5N1 viruses demonstrate that current vaccine candidates continue to provide good antigenic coverage of most isolates within corresponding clades. However, some viruses within clades 2.2, 2.3.4, and 7 show evidence of antigenic heterogeneity (Table 1). While the majority of available clade 2.2 viruses were antigenically similar to currently available vaccine candidates, some recently characterized clade 2.2 viruses from Egypt show evidence of antigenic heterogeneity. For instance, A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 is antigenically distinguishable from previous vaccine candidate viruses and this virus is recommended as a new candidate vaccine virus. Viruses within clade 2.3.2 are antigenically distinguishable from other 2.3 clades. Some recent clade 2.3.4 viruses e.g., A/chicken/Hong Kong/AP156/2008, are antigenically distinguishable from reference strains. Similarly, a recently isolated clade 7 virus, A/chicken/Viet Nam/NCVD-016/2008, is poorly reactive with antisera to current vaccine candidate viruses.

Potential H5N1 vaccine viruses

On the basis of the geographical spread, epidemiology, and antigenic and genetic properties of the H5N1 viruses, national authorities may recommend the use of one or more of the H5N1 candidate vaccine viruses listed in Table 2 for pilot lot vaccine production and subsequent stockpiling of vaccines, should relevant national policies exist.

Additional H5N1 candidate vaccine viruses are being developed as the viruses continue to evolve, and will be announced as they become available. Institutions, companies and others interested in pandemic vaccine development, who wish to receive these prototype viruses, should contact the WHO Global Influenza Programme at GISN@who.int or the institutions listed in announcements published at WHO web site http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinetopics/en/index5.html.

Table 1. Antigenic properties of H5N1 viruses

	REFERENCE FERRET ANTISERA							
	CLADE	1	2.1	2.1	2.2	2.3.2	2.3.4	7
REFERENCE ANTIGENS		VN/1203	IND/5	DK/HU	MG/244	MD/VN	ANH/1	CK/VN
A/Viet Nam/1203/2004 (VN/1203)	1	320	20	40	<10	40	-	<10
A/Indonesia/5/2005 (IND/5)	2.1	10	640	80	80	160	-	80
A/duck/Hunan/795/2002 (DK/HU)	2.1	80	1280	160	-	-	40	-
A/whooper swan/Mongolia/244/2005 (MG/244)	2.2	20	160	160	320	80	-	-
A/muscovy duck/Viet Nam/1455/2006 (MD/VN)	2.3.2	40	160	-	160	320	<10	-
A/Anhui/1/2005 (ANH/1)	2.3.4	40	320	-	<10	-	640	<10
A/chicken/Viet Nam/NCVD-016/2008 (CK/VN)	7	<10	<10	-	-	-	<10	640
TEST ANTIGENS								
A/Thailand/676/2005	1	160	20	-	<10	-	40	-
A/duck/Viet Nam/NCVD16/2007	1	40	<10	-	<10	-	<10	-
A/Indonesia/CDC1031/2007	2.1	<10	640	-	160	-	160	-
A/Indonesia/CDC625L/2006	2.1	40	80	40	20	-	<10	-
A/Turkey/65-596/2006	2.2	160	1280	-	5120	-	320	-
A/egret/Egypt/1162- NAMRU3/2006	2.2	<10	320	-	320	-	<10	-
A/Egypt/3300-NAMRU3/2008	2.2	<10	160	-	80	-	20	-
A/Bangladesh/207095/2008	2.2	<10	320	-	320	-	<10	-
A/common magpie/Hong Kong/5052/2007	2.3.2	80	320	40	-	320	<10	-
A/house crow/Hong Kong/719/2007	2.3.4	<10	80	-	<10	-	320	-
A/chicken/Viet Nam/NCVD74/2007	2.3.4	20	<10	-	<10	-	40	-
A/duck/Viet Nam/NCVD81/2007	2.3.4	<10	<10	-	<10	-	80	-
A/chicken/Hong Kong/AP156/2008	2.3.4	<10	<10	40	<10	40	<10	-
A/chicken/Viet Nam/NCVD-03/2008	7	<10	<10	-	-	-	<10	40

Table 2. Status of H5N1 vaccine virus development as of 20 September 2008

Reassortants with completed regulatory approval			
Virus	Clade	Institution*	Availability
A/Viet Nam/1203/2004	1	CDC and SJ/NIAID	Yes
A/Viet Nam/1194/2004	1	NIBSC	Yes
A/Indonesia/5/2005	2.1	CDC	Requires Indonesian Government permission
A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005	2.2	SJ/NIAID	Yes
A/whooper swan/Mongolia/244/2005	2.2	SJ/NIAID	Yes
A/turkey/Turkey/1/2005	2.2	NIBSC	Yes
A/Anhui/1/2005	2.3.4	CDC	Yes
A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/2006	2.3.4	SJ/NIAID	Yes
A/Cambodia/R0405050/2007	1	NIBSC	Yes
A/duck/Laos/3295/2006	2.3.4	FDA	Yes
Reassortants prepared and awaiting regulatory approval			
Virus	Clade	Institution*	Availability
A/chicken/India/NIV33487/2006	2.2	CDC/NIV	Pending
A/goose/Guiyang/337/2006	4	SJ/NIAID	Anticipated Oct 08
A/common magpie/Hong Kong/5052/2007	2.3.2	SJ/NIAID	Pending
A/duck/Hunan/795/2002	2.1	SJ/NIAID	Pending
Viruses proposed by WHO for candidate vaccine preparation			
Virus	Clade	Institution*	
A/Egypt/3300-NAMRU3/2008	2.2	CDC	
A/Egypt/2321/2007-like	2.2	CDC	
A/chicken/Viet Nam/NCVD-016/2008-like	7	CDC	

- * CDC- Centers for Disease Control and Prevention, USA
- FDA- Food and Drug Administration, USA
- NIAID- National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH, USA
- NIBSC- National Institute for Biological Standards and Control, UK
- NIV- National Institute of Virology, India
- SJ- St Jude Children's Research Hospital, USA

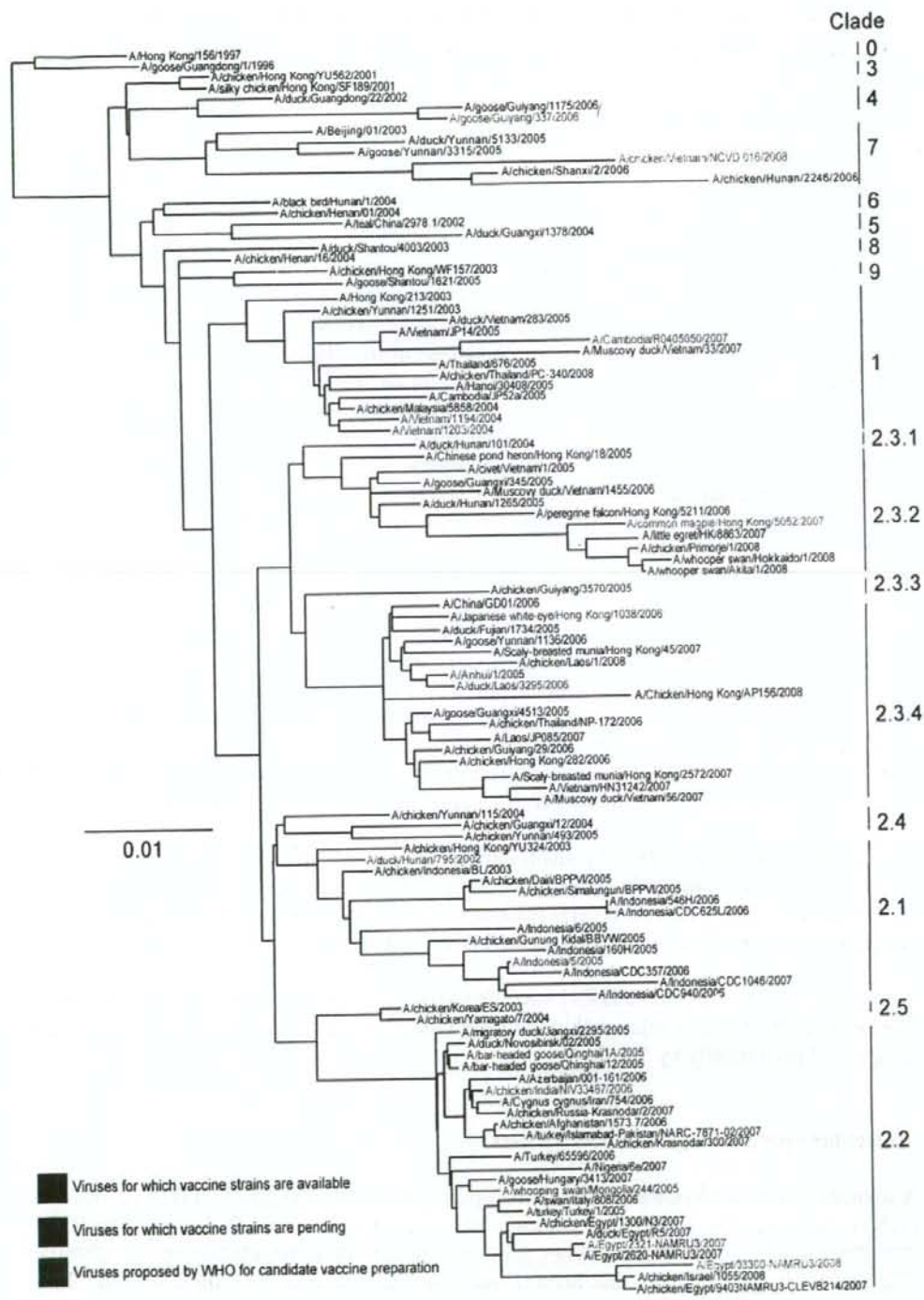


Figure 1. Phylogenetic relationships of H5N1 viruses.

Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines

February 2009

Since their reemergence in 2003, H5N1 influenza viruses have become endemic in some countries and continue to cause outbreaks in poultry and sporadic human infections. It is not known if the next influenza pandemic will be caused by H5N1 viruses or, should one occur, which of the clades of H5N1 viruses would be responsible. However, because an H5N1 pandemic is a possibility, and one with potential for an unusually severe outcome, the development of representative H5N1 candidate vaccine viruses from those available for characterization, coordinated by the World Health Organization (WHO), is an essential component of the overall global strategy for pandemic preparedness. This summary provides an update on the characterization of available H5N1 viruses circulating in birds, including those that have caused human infections, and the current status of the development of candidate H5N1 vaccine viruses. This information may be used to guide national decisions on procurement of H5N1 vaccines.

H5N1 vaccines continue to be developed by manufacturers using clade 1 and clade 2 viruses. Clinical trials have been conducted or are under way in several countries and stockpiles of clade 1 and clade 2 vaccines are being acquired by a number of countries (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/flu_trials_tables/en/index.html). Clinical trials using different viruses should continue as an essential element in pandemic preparedness. Such trials should provide data on priming vaccination schedules, and induction of cross-reactive immunity by vaccines containing viruses from different clades.

Companies are recommended to consult individual national authorities on the specific H5N1 viruses to be used for preparing experimental pilot lots and stockpiles of H5N1 vaccines. Decisions should be based on several considerations including the epidemiology and geographical distribution of the circulating H5N1 viruses.

Comparisons of the candidate H5N1 vaccine viruses with respect to immunogenicity and cross-reactivity and their relationship to newly emerging H5N1 viruses are ongoing, and will be updated periodically by WHO.

Molecular epidemiology of H5N1 viruses

A nomenclature for phylogenetic relationships among the haemagglutinin (HA) genes of H5N1 viruses was devised in consultation with representatives of FAO, OIE, and WHO (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html) (Figure 1). The nomenclature has been recently updated and a manuscript describing this update will be published (<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1750-2640>). The HA sequences of the majority of H5N1 viruses circulating in avian species are separated into a number of distinct clades. Clade 1 viruses have continued to circulate and have been recently isolated in poultry in Cambodia, Thailand and Viet Nam. Although recent human clade 1

infections have been limited to Cambodia, clade 1 viruses have also been previously isolated from humans in China Hong Kong Special Administrative Region, Thailand and Viet Nam. Clade 2.1 viruses have continued to circulate in poultry and have caused human infections in Indonesia. Clade 2.2 viruses have the most geographically diverse distribution and have caused outbreaks in birds in over 60 countries in Africa, Asia and Europe with human infections in Azerbaijan, Bangladesh, China, Djibouti, Egypt, Iraq, Nigeria, Pakistan and Turkey. Clade 2.3.2 and 2.3.4 viruses continue to circulate in birds in Asia; clade 2.3.4 viruses have been responsible for human infections in China, Lao People's Democratic Republic, Myanmar and Viet Nam. Viruses from other clades, including clade 7, have been detected in birds in Asia. Since September 2008, human infections have been caused by clade 2.3.2 viruses in China, clade 2.3.4 viruses in China and Viet Nam, clade 1 viruses in Cambodia, clade 2.2 viruses in Egypt and by clade 2.1 viruses in Indonesia.

Antigenic characteristics of H5N1 viruses

Haemagglutination inhibition (HI) tests of available H5N1 viruses demonstrate that current vaccine candidates continue to provide good antigenic coverage of most available isolates within corresponding clades. In addition, recent data show that the clade 2.1 vaccine virus A/duck/Hunan/795/2002 is antigenically similar to the vaccine virus A/Indonesia/5/2005. However, some viruses within clades 1, 2.1, 2.2, 2.3.2, 2.3.4, and 7 show evidence of antigenic and/or genetic heterogeneity (Table 1 and Figure 1). Within clade 2.3.4, A/chicken/Hong Kong/AP156/2008-like viruses are antigenically distinct from reference strains (Table 2). Antigenic diversity is also present within clade 7 and viruses such as A/chicken/Vietnam/NCDV-03/2008 show reduced reactivity with antisera to the clade 7 reference strain A/chicken/Vietnam/NCDV-016/2008. Of the most recent human isolates from China, A/Guangxi/1/2009 belongs to clade 2.3.2, the first human isolate from this clade. A/Hunan/2/2009, belonging to clade 2.3.4, shows genetic divergence from other viruses of this clade. Both viruses should be considered as potential vaccine strains pending further characterization.

Potential H5N1 vaccine viruses

Potential H5N1 vaccine viruses are listed in Table 3. On the basis of the geographical spread, epidemiology, and antigenic and genetic properties of the H5N1 viruses, national authorities may recommend the use of one or more of these for pilot lot vaccine production, clinical trial, and subsequent stockpiling of vaccines, should such national policies exist.

- Additional H5N1 candidate vaccine viruses are being developed as the viruses continue to evolve, and will be announced as they become available. Institutions, companies and others interested in pandemic vaccine development, who wish to receive these prototype viruses, should contact the WHO Global Influenza Program at GISN@who.int or the institutions listed in announcements published at WHO web site http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinetopics/en/index5.html

