

200808009B

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 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目次

平成 18～20 年度

### I. 総合研究報告

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 \_\_\_\_\_ P1

#### 分担研究報告

1 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

田代真人 \_\_\_\_\_ P10

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 \_\_\_\_\_ P16

3 新型インフルエンザワクチン製造用 LLC-MK2 細胞の有用性に関する研究

影山努、今井正樹 \_\_\_\_\_ P20

協力研究者: 白倉雅之、岸田典子、氏家 誠

4 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

原田勇一、森(二宮)愛 \_\_\_\_\_ P25

5 LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性の検討

城野洋一郎 \_\_\_\_\_ P30

6 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、阿戸 学、小林 和夫、小田切 孝人、  
田代 真人

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

長谷川秀樹 \_\_\_\_\_ P42

協力研究者: 一戸猛志、相内章、佐多徹太郎

8 新型インフルエンザワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

神谷 齊 \_\_\_\_\_ P49

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P56

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 18-20 年度 総合研究報告書

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

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザの家禽および野鳥での流行は、2003 年以降現在も続いており、その間に地球規模で広がり、東南アジア諸国では家禽の間で定着してしまっていることから、もはや制圧することは不可能となった。この間に人への散発的な感染例も絶え間なく起こっており、当該ウイルスに起因した新型ウイルスの出現とパンデミックの発生が危惧されている。このことからパンデミック発生に備えた事前準備が最重要課題となっている。本研究では、新型インフルエンザ対策の根幹となる有効な新型インフルエンザワクチンの安全供給ができる体制の構築とその有効性の検証を基礎研究レベルで実施し、国家備蓄が進められている H5N1 ワクチン株の選定のための情報提供をすることを目的とした。さらに、本研究では品質と安全性の高いワクチン株を供給するために必須である GMP 基準に対応した安全性の検証された細胞株の樹立に成功したことにより、わが国でも独自にヒトに使用できるワクチン種ウイルスの開発と供給の目的が立ったことは新型インフルエンザ対策にとって大きな貢献となった。

本研究期間においては、以下の研究を実施した。①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。②ヒト用ワクチン株製造に必須な GMP 管理された LLC-MK2 細胞のセルバンクを作製し ICH ガイドラインに沿った品質と安全性の検証を実施し、実用化可能なワクチン種ウイルスの供給システムを構築した。③RG 法による各クレードの H5N1 プロトタイプワクチンの試作、RG 法に用いるベクターの改良を行った。④LLC-MK2 細胞の有用性を H5 亜型以外の亜型ウイルスで検証し、季節性インフルエンザワクチン製造にも応用できるか検討した。⑤国家備蓄ワクチンに採用された H5N1 ワクチンについてマウスモデルで免疫原性、交叉反応性、感染防御効果などを評価した。また、その評価法の新規開発と NA 蛋白に対する抗体の感染防御能につて検討した。⑥次世代の新型インフルエンザワクチン開発として、poly(I:C12U)およびキノコ菌糸体抽出物をアジュバントとした経鼻粘膜 H5N1 ワクチンの免疫効果および感染防御能を検証し、粘膜免疫誘導機序を明らかにした。⑦小児における現行のインフルエンザワクチンの接種量を検討し、抗体産生能と安全性を評価し、新型インフルエンザワクチンの小児への適正な接種量設定への基礎情報を提供した。

### 分担研究者

- |                                 |                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| (1) 国立感染症研究所ウイルス第3部<br>田代真人     | 原田勇一、森愛<br>(5) 国立感染症研究所感染病理部<br>長谷川秀樹 |
| (2) 東京大学医科学研究所<br>河岡義裕          | (6) 国立感染症研究所免疫部<br>高橋宜聖               |
| (3) 国立感染症研究所ウイルス第3部<br>影山努、今井正樹 | (7) 国立病院機構三重病院<br>神谷 齊                |
| (4) 国立感染症研究所ウイルス第3部             | (8) (財)化学及血清療法研究所                     |

## 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 (パンデミック) 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リバースジェネティクス (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。これには、RG 法に用いる品質と安全性の検証された培養細胞株が必須である。このような培養細胞は知的所有権により保護されており、わが国では入手も使用も不可能である。従って、本研究で GMP 対応のワクチン株作製の培養細胞株を新規に樹立する。これと並行して、RG 法によるワクチン製造の品質管理、安全性の国際基準の策定に参画し、ガイドラインを作成する。一方、プレパンデミックワクチンとして入手した H5N1 ワクチン株の免疫原性や交叉防御効果を動物モデルで検討し、国家備蓄 H5N1 ワクチン株の選定に際して、判断基準となる情報提供をする。さらに次世代のワクチンとして期待される経鼻接種ワクチンの実用化にむけた基礎開発を実施する。また、現行の季節性インフルエンザワクチンの小児への接種量および抗体応答を詳細に検討し、H5N1 ワクチンの小児への接種量を検討のための情報提供をする。

## B. 研究方法

- ・新型インフルエンザワクチンの開発、承認申請における品質規格と国際基準を策定した。
- ・H5N1 ウイルスの各クレードの代表株から RG 法で弱毒化ワクチン候補株の作製を実施し、

その不活化ワクチンをマウスに接種し、免疫原性を検証した。

- ・MDCK 細胞での RG 法の効率を上げるために、イヌゲノム配列を組み込んだ RG 用プラスミドベクターの開発を行った。
- ・RG 法に使用するヒト用ワクチン株作製用として、LLC-MK2 細胞 (CCL-7.1) を特定した。これについて ICH ガイドライン (Q5A、Q5D) を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等の安全性情報に関する試験を実施した。
- ・本細胞を用いて、RG法によるワクチン株製造効率を A/H5, H6, A/H7, A/H9 亜型ウイルスについて検討した。
- ・H5N1 ワクチン株からアルムアジュバント添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンを作製し、マウスに 2 度腹腔内投与した後、致死性の強毒株の攻撃試験により、防御効果を調べた。また、抗体価を測定して免疫原性を調べた。
- ・バキュロウイルス発現系を用いた H5N1 組換え HA / NA タンパクを用いた ELISA 法による H5N1 ワクチン接種後の抗体測定系を確立し、HA / NA 特異的な血中抗体価の測定を行った。
- ・poly (I:C) アジュバント及び poly I: poly C12U をアジュバントとした経鼻ワクチン接種マウスの血清、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。
- ・2007/08 シーズンの国産ワクチンを用いて、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。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、極力代替法を利用するなどして使用する動物数を最低限に留め、また動物取り扱い・動物愛護に関する規定を遵守した。

## C. 研究結果及び考察

- ・新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準の策定：現在世界各国で開発中の H5N1 型ワクチン製造株および試験ワクチンの性状、試験成績、ならびに各国での臨床

試験成績を比較検討し、各国の現行インフルエンザワクチンの品質基準、WHOの品質基準等と照らし合わせ、安全性および有効性において新型インフルエンザワクチンに対して必要最小限に要求される条件に関する評価を行った。これに伴って、今後国際間で調整すべき課題として1) 血清抗体価の測定方法および表示方式に関する国際的な標準化と、国際参照品の整備、2) 赤血球凝集抑制 (H1) 試験に採用する血球の統一化と中和抗体価との整合性の検討、3) 血清抗体価と感染防御能力、発症阻止能との関連性の解明、4) アルミアジュバントの副反応の検討、などが浮き彫りになった。

・イヌ腎由来 MDCK 細胞のための RG ベクター DNA の開発：DNA の取り込みが悪く、RG 法には不敵とされている MDCK 細胞を RG に採用するために、イヌ PolI プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系を構築したところ、野生型 PR8 が効率よくレスキューされた。さらにワクチン種ウイルス (PR8/H5N1 6:2 reassortant) も効率よく作製された。本研究で確立したイヌ PolI プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系により、MDCK 細胞から H5N1 ワクチンシードウイルスを効率よく作製することが可能となった。

・ヒト用ワクチン製造株作製用培養細胞株の構築：RG でのウイルス回収効率を種々の細胞で検討し、高効率を示した

LLC-MK2-Derivative 細胞を特定した。本細胞を用いて、GMP 施設でマスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、それらについて安全性・特性試験を ICH ガイドラインに沿って実施した。その結果、本細胞は全ての試験項目に合格し、ヒト用ワクチン株の作製に採用できることを確認した。これによって、わが国で初のヒト用インフルエンザワクチン株製造用細胞が確保できた。

・組換え A 型インフルエンザワクチン候補株の作製：LLC-MK2細胞を用いたRG法で、A/H3、A/H5、A/H6、A/H7、A/H9亜型組換えワクチン株を効率よく作製できた。対照として用いたWHOが推奨するVero細胞では、A/H3、A/H6、A/H9亜型ワクチン株では低い効率ながら作製

できたが、A/H7亜型、B型インフルエンザ株は、全く回収されなかった。この結果から、LLC-MK2細胞を用いたRG法では、Vero細胞では作出できなかったB型株、A/H7亜型を含めた多種の亜型のワクチン株製造に適していることが証明された。

・異なるクレードの H5N1 ワクチンのマウスモデルによる交叉防御効果の評価：NIBRG-14 (clade1)、NIBRG-23 (clade2.2) ワクチンをそれぞれマウスへ投与し、ヘテロ H5N1 強毒株を攻撃感染させた。その結果、全マウスが生残り、高い防御効果を発揮した。一方、rgIN5 (clade2.1) ワクチン投与では、Clade1H5N1 野生株の攻撃には、交叉防御効果は部分的であった。以上の結果から、NIBRG-14、NIBRG-23 各ワクチンが発揮する交叉防御効果は十分に高く、幅広い clade の強毒株に対して有効に使用できる可能性が示唆された。平成 20 年度は Clade2.3.4 の RG-Anhui ワクチンの交叉防御効果を解析する。

・組み替え rHA、rNA タンパクを用いた高感度 HA、NA 抗体検出系の作製：3つのプレパンデミックワクチン株 (NIBRG-14、RG-Indonesia/5、RG-Anhui/1) 由来 rHA と、2つのプレパンデミックワクチン株

(NIBRG-14、RG-Indonesia/5) 由来 rNA を作製し、それらを用いた ELISA 法の開発を行った。その結果、抗 HA 抗体の検出感度は飛躍的に改善され、20,000 倍以上希釈した抗血清中の抗 HA 抗体価を検出することが可能となった。これは、HI 試験と比較して 100 倍以上、中和試験と比較して 4 倍以上もの検出感度の改善に相当する。H20 年度は RG-Anhui/1 由来 rNA を作製する。

・H5N1 経鼻ワクチンのマウスによる評価：A/Vietnam/H5N1 ワクチンの経鼻接種により、鼻腔洗浄液中に A/Vietnam/H5N1 特異的な分泌型 IgA が誘導された。同型のウイルスによる攻撃感染時に鼻腔でのウイルス増殖が完全に抑えられ、その結果、マウスの生存率は 100% となった。一方、亜型の異なるワクチン A/PR8 (H1N1) や A/Guizhou (H3N2) を経鼻接種すると、A/Vietnam (H5N1) ウイルスに反応する IgA 及び IgG が僅かに誘導された。その結果、

H5N1 ウイルス攻撃感染後の鼻腔でのウイルス増殖を有意に低下させた。一方、種々のアジュバントについて検討したところ、経鼻ワクチンに polyI:polyC12U がもっとも効果的であることが示唆された。

・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：ブレバンデミックおよびパンデミックワクチンの小児に対する接種量設定への情報提供のために、現行の季節性インフルエンザワクチンを用いて、年齢群ごとの接種量と HI 抗体応答について調査した。初年度は 3 歳未満の小児に国産ワクチン 0.25mL 接種では十分な抗体誘導はできないことを示した。H19-20 年度も同様の調査を継続し、国産ワクチン、海外ワクチン（サノフィワクチン）での抗体応答の違いを検討し、海外ワクチンが免疫原性が強いことを示した。

#### D. 結論

・ヒト用インフルエンザワクチン製造用種ウイルス作製の培養細胞 LLC-MK2 細胞の細胞バンクの構築に成功し、わが国でもヒト用のインフルエンザ H5N1 ワクチン株の供給が可能となった。

・RG ワクチンの品質管理基準、安全性評価基準に関する各種ガイドラインを策定し、国際基準の導入体制の準備ができた。

・異なるクレードの国家備蓄 H5N1 ワクチンの免疫原性、交叉防御効果について動物実験で評価した。

・RG 法に用いる DNA ベクターの改良により、高効率で H5N1 弱毒化ウイルスの作製が可能となった。また、MDCK 細胞を RG に採用できるベクターの開発に成功した。

・高感度で H5N1 抗体を測定できる ELISA 系の構築に成功した。

・不活化インフルエンザ経鼻ワクチン用の最適なアジュバントを特定できた。これによって、経鼻インフルエンザワクチンの実用化へ前進した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

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

小田切孝人 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザと新型インフルエンザに備えた事前準備と国際協力 *ウイルス* 56, 77-84, 2006

小田切孝人、今井正樹、二宮愛、峰川晴美、納富継宣、田代真人 ランプ法による H5N1 高病

- 原性鳥インフルエンザの診断 インフルエンザ 7,201-209, 2006
- 小田切孝人 リバースジェネティクスによる弱毒化 H5N1 鳥インフルエンザワクチンの開発と応用 日本臨床 64, 1855-1864, 2006
- 小田切孝人 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの最近の動向と国家備蓄ワクチンカレントセラピー 24, 27-33, 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, 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
- 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. 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

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、田代眞人、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、田代眞人 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、田代眞人、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、田代眞人、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、田代眞人 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、田代眞人、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、田代眞人、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) 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

Takato Odagiri Antiviral resistance surveillance of influenza viruses in Japan. Workshop on antiviral resistance monitoring, The 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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 H5N1(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)

小田切孝人 新型インフルエンザワクチン  
第12回日本ワクチン学会、熊本、11月 (2008)

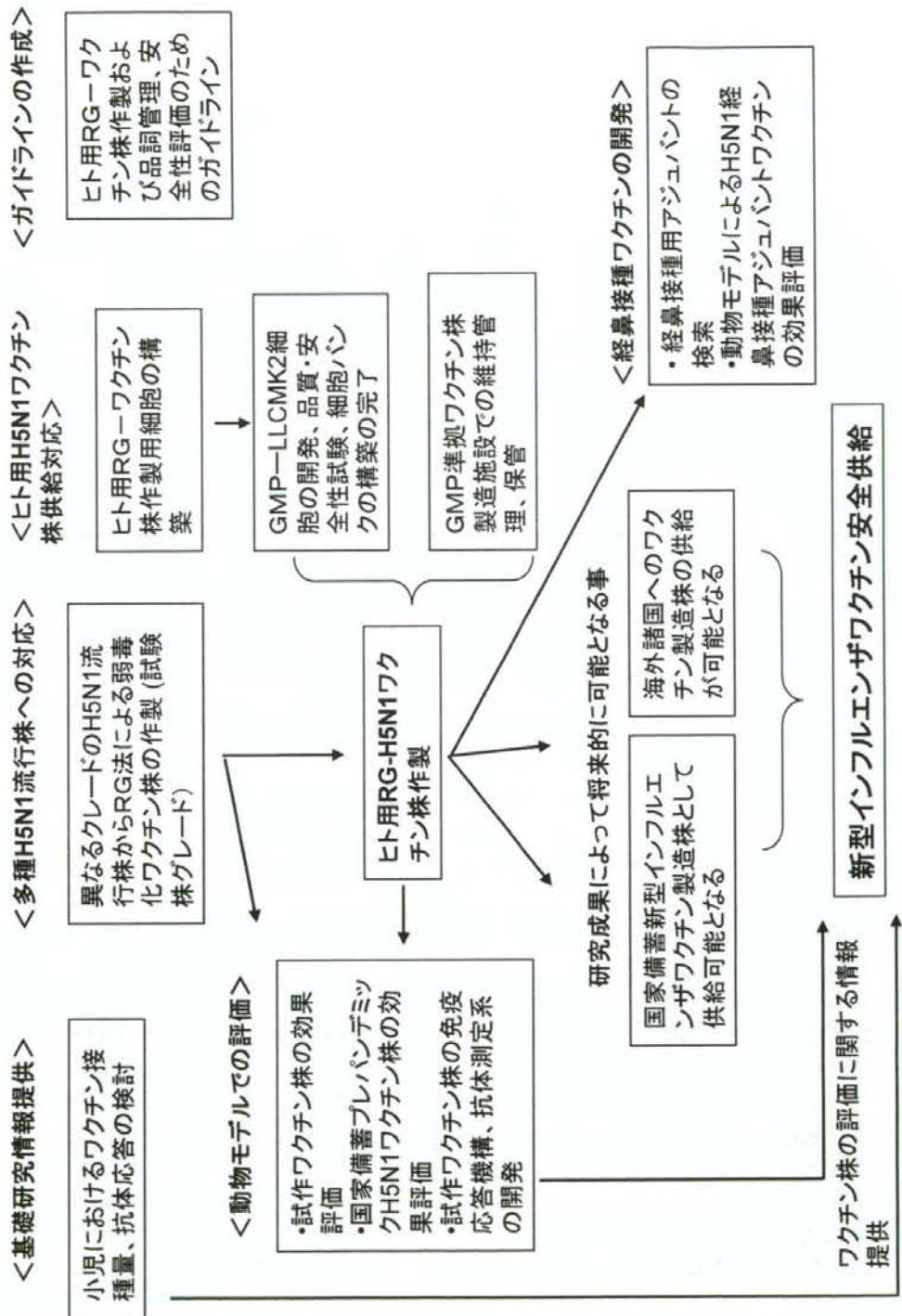
小田切孝人 新型インフルエンザの脅威とそ  
の対策 第22回九州免疫血清研究会、大分、  
11月 (2008)

小田切孝人 新型インフルエンザ対策と H5N1  
プレパンデミックワクチン開発 沖縄感染免  
疫シンポジウム、沖縄、11月 (2008)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

# 研究概要と各分担研究との連携



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

**研究要旨** 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、リバース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。さらに、H5N1ワクチンの臨床試験が各国で進み、プレパンデミックワクチンの事前備蓄が具体性を持ってきた。プレパンデミックワクチンにおいては、パンデミック開始以前に接種する可能性があるため、十分な安全性に関する試験を実施することが必要であり、また時間的にも可能である。そこで、このような経緯を踏まえ、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、新型インフルエンザワクチンの品質に対する国際基準の改訂を進めた。

**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(リバース・ジェネテ

ィクス)が開発されてきた。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フティーに関するリスク評価基準」をまとめたが、昨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、リバース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。

## 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を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、最後に添付してある。）

## C. 研究成果および、D. 考察

現在世界各国で開発中のH5N1型ワクチン製造株および試験ワクチンの性状、試験成績、ならびに各国での臨床試験成績を比較検討し、さらに各国の現行インフルエンザワクチンの品質基準、WHOの品質基準等と照らし合わせ、安全性および有効性において新型インフルエンザワクチンに対して必要最小限に要求される条件に関する評価を行った。その結果、ほぼ現在の基準に沿った原案を作成することが出来た。

今後の問題点としては、

1. 血清抗体価の測定方法が各施設で統一されておらず、更にその表示方法にもばらつきがあり、各施設からの成績をそのまま比較することが困難な状況にある。抗体測定方法およびその表示方式に関する国際的な標準化と、国際参照品の整備が緊急課題である。これについては、WHOが中心となって、国際基準を作成中である。
2. 赤血球凝集抑制(HI)試験については、用いる血球によって抗体価が大きく異なり、中和抗体価との整合性を検討する必要がある。
3. H5N1型ウイルスについては、血清抗体価と感染防御能力、発症阻止能との関連性が不明であり、これらに関する成績を集積する必要がある。これらについては、動物実験から、現在の季節性ワクチンに対する国際基準が準用できることが示唆された。さらに、緊急事態においては、SRDの結果から直接効果を推定することも試みられている。
4. アルミアジュバントを添加することによる副反応等に関しても、十分な知見が得られて折らず、更に新規のアジュバントについては実績が無いために、評価基準の設定が困難である。しかし、これらについては、動物実験、臨床試験の進捗状況から、安全性に危惧が生じるような報告はなく、現時点では特に問題とはなっていない。

5. 抗原変異および異なる Clade, Sub-clade のウイルスに対する交叉反応性についても、交叉 HI 試験や交叉中和試験の成績を以て、ヒトにおける交叉防御能を評価することが困難である。しかし、動物実験においては、アジュバント添加ワクチンでは、H5N1 亜型間であれば、Clade, Sub-clade, 多少の抗原変異ウイルスに対しても、交差防御が期待できることが明らかにされてきた。

WHO のガイドライン (2003) に沿って、現在開発中の H5N1 型試験ワクチン製造に関してリスク評価を行ったところ、製造株 (NIGRG-14) に関して特にバイオセフティー上で問題となる点は指摘できなかった。我が国のワクチンメーカーの製造設備を考慮すると、極めて安全性の高い製造株であると判断された。今後は、最終案に沿って、我が国におけるインフルエンザワクチン製造株の開発に関するガイドラインを作製する必要がある。

今後、これらの問題について解決を進めると共に、随時基準を改定し、より安全で有効な新型インフルエンザワクチンの迅速、大量、安定供給を図る必要がある。

## 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 (リバーズ・ジェネティクス) が開発されてきた。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 万人分のプレバンデミックワクチン原液が製造され、国家備蓄された。

## F. 発表等

Horimoto, T., et al.: The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24; 3669-3676, 2006

Monto, A. S. et al.: Influenza viruses resistant to the neuraminidase inhibitors detected during the first three years of their use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2395-2402, 2006

Imai, M., et al.: 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., et al.: Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbiol. Infect.* 2006 (in press)

Kamijuku H., et al.: Mechanism of NKT cell-mediated nasal vaccine which induces effective cross-protection against highly pathogenic avian influenza. *J. Clin. Invest.* 2006 (in press)

WHO criteria for accepting positive results of H5N1 infection in humans from national reference laboratories. November 2006

Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A(H5N1) virus infection. : Guide for field operations, October 2006

Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine viruses developed for potential use as pre-pandemic

- vaccines, WHO Recommendation, 18 August 2006
- WHO case definitions for human infections with influenza A(H5N1) virus, 29 August 2006
- WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1), October 2006
- Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply, WHO/IVB/06.13 - WHO/CDS/EPR/GIP/2006.1
- WHO Rapid Advice Guidelines on pharmacological management of humans infected with avian influenza A (H5N1) virus, May 2006
- Avian influenza, including influenza A (H5N1), in humans: WHO interim infection control guideline for health care facilities, Revised 24 April 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* 2007 (in press)
- Asahi-Ozaki, Y., Itamura, S., Ichinose, T., Steng, P., Tamura, S., Sawa, H., Tadano, M., Sato, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H.: Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbiol. Infect.* (in press)
- Kamijuku H., Nagata, Y., Jiang X., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, Y., Hase, K., Ohno, H., Shimaoka, T., Tonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Ichinose, T., Hasegawa, H., Seino, K.: Mechanism of NKT cell-mediated nasal vaccine which induces effective cross-protection against highly pathogenic avian influenza. *J. Clin. Invest.* Shirato, K., Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F.: Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification *J. Virol. Methods* 139; 78-84, 2007
- Okada, M., Okuno, Y., Hashimoto, S., Kita, Y., Kanamaru, N., Nishida, Y., Tsunai, Y., Inoue, R., Nakatani, H., Fukamizu, R., Namie, N., Yamada, J., Takao, K., Asai, A., Asaki, R., Kase, T., Takemoto, Y., Yoshida, S., Peiris, J.S.M., Chen, P.-J., Yamamoto, N., Nomura, N., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models *Vaccine* 25; 3038-3040, 2007
- 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
- Kato, A., Kiyotani, K., Kubota, T., Yoshida, T., Tashiro, M., Nagai, Y.: Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice *J. Virol.* 81; 3264-3271, 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
- 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 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:PolyC<sub>12</sub>U 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)

G. 知的所有権の取得状況  
なし

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所教授

### 1. 研究目的

H5N1 ウイルスによるパンデミックの可能性から、有効なワクチンを効率よく作製する戦略が求められている。そこで、（１）ワクチン効果の高いワクチンシードウイルスの作製と、（２）MDCK 細胞で効率よくワクチンシードウイルスを作製する系の確率を目的として、本研究を行った。

### 2. 研究方法

（１）clade 1 から 3 株（A/Vietnam/IMS3030/2004, A/Vietnam/IMS30262, A/Vietnam/IMS30259/2004）、clade 2 から 2 株（A/Indonesia/7/2005, A/Hanoi/30850/M2/2005）を選択し、それぞれの株の NA と HA 遺伝子をクローニングし、HA 遺伝子は弱毒型に改変した。この弱毒化 HA と NA を前述の 5 株の H5N1 から、他の 6 本は発育鶏卵での増殖性が高い A/Puerto Rico/8/34(PR8)株 (H1N1) の遺伝子を用い、リバースジェネティクス法を用いてシード候補ウイルスを作製した。このウイルスをホルマリンにより不活化した後、マウスに接種し、得られた血清を用いて血清学的検査を行なった。

（２）MDCK でのリバースジェネティクスの効率を上げるために、イヌゲノム (GenBank No. NW\_87894) 上で推定される配列をもとに、MDCK 細胞のゲノム DNA からイヌ Poll プロモーター領域をクローニングし、マウス Poll ターミネーター配列を持つプラスミドに組み込み(pPollC)、MDCK 細胞におけるそのプロモーター活

性をルシフェラーゼアッセイで調べた。さらに PR8 由来の 8 遺伝子および A/Vietnam/1194/04 (VN1194, H5N1)由来の弱毒改変型 HA、NA 遺伝子を pPollC プラスミドに組み込み、MDCK 細胞から野生型 PR8 および PR8/H5N1 6:2 reassortant が作成可能かを調べた。

さらに HA/NA バランスを決定するために、HA、NA を VN1194 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、MDCK 細胞での増殖に適した他のウイルス(PR8, A/WSN/33, A/Kanagawa/173/03, A/Hong Kong/213/03)由来の NINA や VN1203 由来 NA のストック領域を長くした NA (VN1203Fill)と置き換えて 6:1:1 reassortant を作製し、PR8/VN1194 あるいは PR8/VN1203 よりも有意に良く増殖するウイルスを、プラークのサイズやウイルス力価を指標として検索した。

### 3. 研究結果及び考察

（１）本研究で作製したワクチンシード候補ウイルスは、発育鶏卵、Vero 細胞、Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞で、高い増殖性を持つことが分かった。また、ワクチンシード候補株をマウスに 3 回接種したところ、HI 抗体価と中和抗体価が上昇し、十分な抗体産生能を有することが分かった。さらに、他の H5N1 ウイルスに対する交叉反応も見られた。インフルエンザウイルスは、抗原性が変化しやすいことから、パンデミックの危険に備えて、複数のワクチンシード候補ウイルスを用意しておく必要がある。さらに、出来るだけ交叉反応性を有するものが望ま

れる。今回作製したウイルスは、他の H5N1 ウイルスに対しても交叉反応が見られたことから、有効なワクチンシードウイルスになり得ると考えられる。

(2) MDCK 細胞 DNA から Poll プロモーター領域をクローニングした。MDCK 細胞において、そのプロモーター活性を測定したところ、ヒト Poll プロモーターよりも有意に高い値を示した。そこでイヌ Poll プロモーターを用いたリバースジェネティクス系を構築したところ、野生型 PR8 が効率よくレスキューされた。さらにワクチンシードウイルス(PR8/H5N1 6:2 reassortant)も効率よく作製された。本研究で確立したイヌ Poll プロモーターを用いたリバースジェネティクス系により、MDCK 細胞から H5N1 ワクチンシードウイルスを効率よく作製することが可能となった。

ブラン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 のブランクサイズが 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。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

本研究により、有効なワクチンシード候補株の作出に成功したこと、また MDCK 細胞での効率よくワクチンシードウイルスを作製するために、新しいリバースジェネティクスの系や、HA/NA バランスを解明することが出来たことから、当初の研究目標が十分に達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究で得られた成果は、インフルエンザのパンデミック対策に役立つものであ

り、学術的のみならず、国際的、社会的意義は、非常に高い。

##### 3) 今後の展望について

本研究で得られた知見をもとに、より有効かつ安全で経済的なワクチンの開発を目指す。

#### 5. 結論

本研究で得られた知見は、MDCK 細胞でのワクチン製造効率の向上に貢献すると期待される。

#### 6. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	1 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等) の発表	0 件

その主なもの

論文発表

なし

学会発表

村上晋、堀本泰介、河岡義裕「イヌ RNA ポリメラーゼ I プロモーターを用いたインフルエンザリバースジェネティクス系の確立と H5N1 ワクチンシードウイルスの作製」第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月

##### 2) 海外

口頭発表	0 件
原著論文による発表	17 件
それ以外 (レビュー等) の発表	1 件

その主なもの

論文発表

Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol* 50:73-81, 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** 80:2318-25, 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.
- Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida A, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. **Nature** 439:490-492, 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.
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso K, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. **Nature** 444:378-382, 2006.
- 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.
- Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Kawaoka Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice **PLoS Patho** 3:1374-1379, 2007.
- Rigoni M, Shinya K, Toffan A, Milani A, Bettini F, Kawaoka Y, Cattoli G, Capua I. Pneumo- and eutropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. **Virology** 364, 28-35, 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, 547-552, 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** 82:1146-1154, 2007.
- Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A,