

200829034A

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザの発生予測、早期検知、リスク評価  
および大流行に対する事前準備と緊急対応に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人  
平成 21 年(2009)3 月

## 目次

平成 20 年度

- I 総括研究報告書  
新型インフルエンザの発生予測、早期検知、リスク評価および大流行に対する事前準備と  
緊急対応に関する研究 P.1  
研究代表者：田代真人
  
- II 分担研究報告書
1. 鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構 P.11  
研究分担者：喜田宏
  
2. ウイルスの宿主域決定要因と人への馴化機構、ウイルス病原性の分子基盤の解明 P.14  
研究分担者：河岡義裕
  
3. 飛沫・飛沫核の拡散特性の解明に関する研究 P.16  
研究分担者：岡部信彦 研究協力者：井上栄、井原義文、小原弘道  
新型インフルエンザ等におけるリスクコミュニケーション  
研究分担者：岡部信彦 研究協力者：山寺静子、他5名
  
4. インフルエンザワクチン有効性評価法の開発 P.22  
研究分担者：高橋宜聖 研究協力者：小野寺大志、小林和夫、小田切孝人、田代真人
  
5. 新型インフルエンザウイルスの感染予防法の開発 P.26  
研究分担者：長谷川秀樹 研究協力者：相内章、田村慎一、佐多徹太郎、田中伸哉
  
6. 2007/2008 シーズンのわが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現頻度に関する  
研究 P.33  
分担研究者：西藤岳彦 協力研究者：鈴木宏、齋藤玲子、鈴木康司
  
7. 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に関する研 P.36  
究  
研究分担者：小田切孝人 協力研究者：氏家誠、小淵正次、影山努、白倉雅之、岸田典子、  
鳥袋梢、望月菊、堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲
  
8. 新型インフルエンザ対策のウイルス学的評価、リスク評価 P.44  
研究分担者：押谷仁 協力研究者：鈴木陽、古瀬祐気
  
9. トリ型からヒト型への変化に関する分子基盤 P.48  
研究分担者：鈴木康夫

新型インフルエンザの発生予測、早期検知、リスク評価  
および大流行に対する事前準備と緊急対応に関する研究  
総括報告書

研究代表者 田代眞人 国立感染症研究所ウイルス第3部 部長

**研究要旨** 大きな健康被害と社会・経済的な影響を与える新型インフルエンザの出現が危惧されている。特に、2003年暮れから東アジア地域における H5N1 型高病原性鳥インフルエンザの大流行は東南アジア、シベリア、インド、中東、ヨーロッパ、アフリカへ拡大し、東南アジアではトリの間で定着してしまった。さらに、強毒型のトリ型ウイルスの感染によって 63%という高い致死率を示すヒト感染例が 400 名を越えた。このような高病原性ウイルスに由来する新型インフルエンザ大流行の場合には、未曾有の健康被害とそれによる社会・経済活動の麻痺・崩壊が生じることが懸念される。そこで、これに応じた事前準備と大流行時の緊急対応の具体的な行動計画を策定し、新型インフルエンザ健康危機管理体制を確立することが緊急課題となっている。本研究は、この事態に即応して、新型インフルエンザ大流行の際に、健康被害を最小限にとどめ、社会機能の維持を目的とした緊急対策・行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤を確立することを目的とした。

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

今年度の研究成果は直ちに厚労省の新型インフルエンザ対策ガイドラインの実施およびその改定に応用され、平成 21 年 2 月のガイドライン改定に生かされた。さらに WHO によるパンデミックインフルエンザ準備ガイドラインの改定にも応用された。一方、ワクチン緊急開発の成果は備蓄ワクチンの作製に応用された。これらの結果、わが国における新型インフルエンザ対策準備は、特に公衆衛生面において従来に比較して格段に進展したと評価できるが、更に社会危機への準備対応が必要である。

研究分担者

喜田 宏 北海道大学大学院  
河岡義裕 東京大学医科学研究所

岡部信彦 国立感染症研究所  
感染症情報センター  
高橋宜聖 国立感染症研究所免疫部

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部  
小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第3部  
西藤岳彦 (独行法)動物衛生研究所  
押谷 仁 東北大学大学院  
鈴木康夫 中部大学生命健康科学部

## A. 研究目的

2003 年後半以来、東アジア地域で発生した H5N1 型高病原性鳥インフルエンザの大流行は東南アジア、シベリア、インド、中東、ヨーロッパ、アフリカへ拡大しているが、依然制圧される可能性は無く、何時でも人の世界に新型インフルエンザとして侵入して大流行を起こすことが危惧されている。高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の流行拡大にともなう、偶発的な人の感染例も増加しており、特に現在の H5N1 型ウイルスは宿主域が広く病原性が昂進してきているため、人においても 63%という高い致死率を示す重症疾患となっている。さらに、ウイルスの遺伝子変異が引き続き起こっており、徐々にヒト型のウイルスに近づきつつあると考えられている。

このような高病原性ウイルスに由来する新型インフルエンザ大流行の場合には、無差別多数の患者、死亡者の発生によって未曾有の健康被害が生じることが危惧される。特に、最も感染リスクの高い医療関係者にも多くの健康被害が生じて医療サービスの低下などの健康危機が起こることが憂慮される。さらに、これらに起因する交通・物流サービスの低下による食糧やエネルギー供給、一般的な社会サービスなどの社会・経済機能や治安体制の麻痺、破綻、更には社会危機が生じることが懸念されている。

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

厚生労働省では、平成 17 年 11 月に新型インフルエンザ対策行動計画を発表したが、それに応じ

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

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

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

## B. 研究方法

- 1) 新型インフルエンザ出現機序の解明

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

b) ウイルス糖タンパク側のレセプター結合特性と多くの動物種の宿主細胞側のウイルスレセプターの結合を分子レベル、分子、電子レベルで解析し、宿主域を超えるレセプター要因を検討した。

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

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

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

## 2) 新型インフルエンザ出現予測方法の検討

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

## 3) 新型インフルエンザ出現・流行動向監視体制の確立

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

## 4) 新型インフルエンザ迅速診断キットの開発

先に SARS 迅速診断用に開発した遺伝子増幅

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

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

## 5) 新型ウイルスの性状解析と緊急ワクチン開発方法の確立および製造・供給・接種体制及び効果・副作用のモニター体制の整備、ならびにプレパンデミックワクチンの備蓄と使用方法の検討

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

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

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

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

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

## 6) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立

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

7)鳥インフルエンザウイルスおよび新型ウイルスのヒトに対する感染病理機構の解明

ヒトに対する鳥インフルエンザウイルス感染の発症病理機構の実態を検討した。特に小児・若年者に健康被害が多い理由を検討した。

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

8)次世代の新型インフルエンザワクチンの開発研究

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

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

この結果、一部にミスマッチをもつ2重鎖RNA(Ampligen)を添加して経鼻接種すると、局所IgA抗体、血清IgG抗体、細胞性免疫が誘導

された。さらに、接種ウイルスのみならず、抗原的にも大きく異なる別の亜型、別のクレードのウイルスにも、高い交差免疫が誘導できることが示された。

そこで、実用化を目指して、動物を用いた非臨床試験を企画した。

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

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

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

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

10)公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応のあり方の検討

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

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

これらの結果をもとに、多数の患者が出現する事態における社会危機管理のあり方と緊急対応の具体的項目を提起した。

11)諸外国の新型インフルエンザ対策計画の比較

## 検討と国際協力の推進

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

### 12)机上演習の企画と実施

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

### 13)ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立

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

### 14)飛沫・飛沫核の拡散特性の解明

喘息者にマスク着用させた際の風圧・風速等によりモデル粒子・ミストの拡散を定量した。

## C. 結果

(1)鳥ウイルスに対するレセプターの分布、構造の詳細を、様々な動物種において解析し、イヌ、ネコなどの多くの動物がH5N1鳥インフルエンザウイルスに対して感受性を持つことの、分子基盤を明らかにした。

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

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

(2)インフルエンザ流行期におけるウイルス学

的・疫学的な詳細な解析を行って、欠落している必要情報を集積し、新型インフルエンザ出現予測の感度と特異性を検討した。また H5N1 感染症例、予想される新型インフルエンザの症例検討から、症例定義、診断検査方針を検討し、新型インフルエンザ対策計画および対策ガイドラインを改定した。さらに WHO のパンデミックインフルエンザ準備計画の改定を行った。た。

(3)流行中の鳥ならびに人ウイルスの全てを検出できる RT-PCR プライマーを設計・改良し、WHO 標準プライマーとして公表し、その後分離された多くの H5N1 ウイルスについて検出感度を検討した。また、簡易迅速診断キットとして LAMP 法を開発し、国内で市販された。

(4)2004 年ベトナム分離株に基づき、リバースジェネティクスを用いて弱毒ワクチン製造候補ウイルスを作出した。アルミアジュバント添加全粒子不活化ワクチンを作製し、非臨床試験、第 1 相臨床試験を行った結果、免疫原性、安全性には問題はなく、ウイルス抗原の節約が可能であった。第 2+3 相試験を実施し、製造承認を申請し、取得した。この成果は WHO 会議でも高く評価され、他国でも同方式による新型ワクチン開発を進めている。

さらに 2005 年インドネシア分離株(Clade2.1)由来の備蓄用ワクチン(1 千万人分)の製造への応用に引き続き、2007 年には安徽株ワクチン(Clade2.3)の備蓄が行われた。さらに、2008 年度には青海株(Clade2.2)の国家備蓄を行った。

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

(5)NISN に参画し、2001 年以来の流行ウイルスの薬剤感受性と遺伝子変異を調べた結果、現時点での耐性ウイルスは 1%未満であったが、治療後に耐性が発現する可能性が示唆された。しかし、2007/08 シーズンでは、N275Y によってタミフル耐性となった H1N1 が日本にも侵入し、2008/2009 シーズンには H1N1 のほぼ 100%がタ

ミフル耐性であることが明らかになった。この事実は、新型インフルエンザウイルスにおいても、薬剤耐性が出現する可能性を示唆しており、複数の抗ウイルス剤を備蓄して、リスク分散しておく必要性を示している。

また H5N1 ウイルスに対しては、治療にはタミフル通常量の 2 倍量で 10 日間投与する必要が示唆された。

(6)高病原性 H5N1 ウイルスの人感染では、ウイルスは全身臓器へ感染が拡がり、HA の解裂部位がこれを規定していた。また NS1 と PB2 および PB1-F2 遺伝子がサイトカインストームと多臓器不全をもたらすことが分かった。一方、5N1 型不活化全粒子ワクチンの中和抗体誘導能は低いが、マウスに感染防御効果を付与でき、この感染防御因子は抗体であった。これらに基づき、TLR3 を標的とした 2 重鎖 RNA 添加経鼻ワクチンを開発し、サル実験で有効性と広い交叉免疫誘導を確認した。また組織培養ワクチン開発を進め、MDCK 細胞高増殖性の NA 欠損 A/VietNam/1194/2004 株を作出した。

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

分担研究者の研究成果

・研究代表者 (田代真人)

(1) 鳥で流行中のインフルエンザウイルスの遺伝子、抗原性、生物性状等を比較検討し、新型インフルエンザ出現の可能性、健康被害、社会的影響等のリスク評価を行った結果、H5N1 は徐々にヒト型に変化しており、新型インフルエンザへの進展と、ヒトに対する高病原性も維持される可能性が高いと判断された。

(2)H5N1 への準備対応が不可欠であり、これらが十分であれば、他の亜型の新型インフルエンザにも対応可能と予想された。特に H5 に関しては、備蓄ワクチンの事前接種 (プライム・ブースト戦

略) の有効性が示唆された。

・研究分担者 (喜田宏)

(1) 渡りガモおよびハクチョウの糞便材料から 75 株のインフルエンザ A ウイルスを分離同定した。また、本年 5 月に北海道の野生オオハクチョウの斃死体から、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを分離同定した。高病原性鳥インフルエンザウイルス A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) 株の豚における増殖に PB2 タンパクが関与することがわかった。

・研究分担者 (河岡義裕)

(1) 鳥ウイルスのヒト型への変身要因として、HA 蛋白レセプター認識部位の変異と RNA ポリメラーゼ変異による低温の増殖性が示された。遺伝子の解析から、H5N1 型はヒト型へ、さらに上気道で効率よく増殖するようになってきている。またウイルス継代によりヒト型への変異が生じて蓄積することが示された。

(2) トリ (及びヒト) への強毒性は、ヒト型への変異要因とは異なる数カ所の遺伝子部位が規定している。流行中の H5N1 ウイルスでは弱毒化の傾向は無く、H5N1 新型ウイルスには、強毒性が維持される可能性が高い。

・研究分担者 (小田切孝人)

(1) H5N1 ウイルス感染診断系を改訂し、リアルタイム RT-PCR による Type A, H5, N1 亜型の同時同定を可能にした。これらは、検疫所、地方衛生研究所検査担当者へ技術移転され、これによって、わが国で統一された最新版マニュアルを用いた診断検査が可能となった。

(2) オセルタミビル耐性 H1N1 ウイルスの緊急調査を行った。全国 1734 株の H1N1 ウイルスの 45 株 (2.6%) が耐性で、海外より低頻度であった。耐性株はザナミビル感受性、抗原性はワクチン株 A/ブリスベン/59 類似であった。

・研究分担者 (高橋宜聖)

(1) マウスでブレパンデミックワクチン (NIBRG-14, Anhui 株) の感染防御機構を解析した。H5N1 ワクチンは H1N1 ワクチンに比べ抗 NA 抗体の惹起能が高く、これが抗 HA 抗体と協調的に感染防御に寄与していた。



(2) ワクチン接種者の血清抗体を移入したマウスの感染防御能解析方法を確立した。

・研究分担者(長谷川秀樹)

(1) 新型インフルエンザワクチンには強い交叉防御効果が望まれ、経鼻ワクチンが期待される。安全・有効な天然由来粘膜アジュバントを探索し、4種理のキノコ菌糸体抽出物の有効性が確認された。マウスにおいて、A/Vietnam/1194/2004由来の全粒子ワクチンは異なる clade の A/Indonesia/6 感染に対し防御効果が示された。

・研究分担者(西藤岳彦)

(1) 2007/08年の北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎での A/H1N1 Os 耐性変異(H275Y)は0.4%と低かった。

・研究分担者(押谷仁)

(1) データベースで過去100年のインフルエンザウイルスのアマタジン耐性遺伝子について検討した結果、宿主による進化の違いが明らかになった。

・研究分担者(鈴木康夫)

(1) 高病原性トリインフルエンザウイルスがヒトへ伝播可能とするレセプター認識変異を簡便に測定する基本技術を開発した。これにより、パンデミック発生を分子レベルで事前に監視できる可能性を得た。生体中のトリおよびヒトインフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖分子群の定量的測定技術を開発した。

・研究分担者(岡部信彦)

(1) マスク着用によって、咳の際の風圧、風速は1/10になり、粒子の飛散量も8%に減少した。完全とはいえないまでもウイルスの拡散リスクの低減には役立つと考えられる。

(2) 電話相談窓口を試験的に開設したところ、多様な問い合わせがあり、対応者の問題が浮かび上がった。

#### D. 考察

本研究の結果、1) 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発、2) 新型インフルエンザ出現を検知する監視体制の確

立、3) LAMP法による新型インフルエンザ迅速診断キットの開発・改良・普及、4) 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立、5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立、6) 緊急医療サービス確保体制の確立、7) 感染病理機構の解明に基づく有効かつ安全な予防方法(経鼻投与ワクチン開発)と治療方法の開発、8) 健康危機管理、社会危機管理体制の整備が行われ、新型インフルエンザ大流行による健康被害の最小化と、社会・経済機能の崩壊を防止するための方策が提起された。

これらの結果は直ちに行政対応に応用され、昨年度では平成16年11月には厚生労働省が新型インフルエンザ対策行動計画を我が国のガイドラインとしてまとめたが、その後本研究の成果を中心として、平成17年6月にはH5N1感染症を指定感染症として予め指定し、更に6月にはフェイズ3までの新型インフルエンザ対策ガイドラインを策定し、平成19年3月にはフェイズ4以後ガイドラインを作成した。さらに本年度は、平成21年2月に、新型インフルエンザ対策ガイドラインの全面的見直しを行った。

また、備蓄ワクチンについては、接種対象者の優先準備の検討、事前接種政策について検討を行った。さらに、安全性、有効性(特に交差免疫性)の検討の目的で行われた臨床研究に、全面的に協力した。今後は、これらの結果に基づいた具体的な施策を決めていくことになる。

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

#### E. 結論

(1) 鳥で流行中のインフルエンザウイルスの遺伝子、抗原性、生物性状等を比較検討し、新型インフルエンザ出現の可能性、健康被害、社会的影響等のリスク評価を行った結果、H5N1は徐々に

ヒト型に変化しており、新型インフルエンザへの進展と、ヒトに対する高病原性も維持される可能性が高いと判断された。

(2)H5N1 への準備対応が不可欠であり、これらが十分であれば、他の亜型の新型インフルエンザにも対応可能と予想された。特に H5 に関しては、備蓄ワクチンの事前接種（プライム・ブースト戦略）の有効性が示唆された。

(3) 渡りガモおよびハクチョウの糞便材料から75株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。また、本年5月に北海道の野生オオハクチョウの斃死体から、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを分離同定した。高病原性鳥インフルエンザウイルス A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1)株の豚における増殖にPB2タンパクが関与することがわかった。

(4) 鳥ウイルスのヒト型への変身要因として、HA 蛋白レセプター認識部位の変異とRNAポリメラーゼ変異による低温の増殖性が示された。遺伝子の解析から、H5N1 型はヒト型へ、さらに上気道で効率よく増殖するようになってきている。またウイルス継代によりヒト型への変異が生じて蓄積することが示された。

(5) トリ（及びヒト）への強毒性は、ヒト型への変異要因とは異なる数カ所の遺伝子部位が規定している。流行中の H5N1 ウイルスでは弱毒化の傾向は無く、H5N1 新型ウイルスには、強毒性が維持される可能性が高い。

(6)H5N1 ウイルス感染診断系を改訂し、リアルタイム RT-PCR による Type A, H5, N1 亜型の同時同定を可能にした。これらは、検疫所、地方衛生研究所検査担当者へ技術移転され、これによって、わが国で統一された最新版マニュアルを用いた診断検査が可能となった。

(7)オセルタミビル耐性 H1N1 ウイルスの緊急調査を行った。全国 1734 株の H1N1 ウイルスの 45 株（2.6%）が耐性で、海外より低頻度であった。耐性株はザナミビル感受性、抗原性はワクチン株 A/ブリスベン/59 類似であった。

(8)マウスでプレパンデミックワクチン

(NIBRG-14、Anhui 株) の感染防御機構を解析

した。H5N1 ワクチンは H1N1 ワクチンに比べ抗 NA 抗体の惹起能が高く、これが抗 HA 抗体と協調的に感染防御に寄与していた。ワクチン接種者の血清抗体を移入したマウスの感染防御能解析方法を確立した。

(9)新型インフルエンザワクチンには強い交叉防御効果が望まれ、経鼻ワクチンが期待される。安全・有効な天然物由来粘膜アジュバントを探索し、4 種理のキノコ菌糸体抽出物の有効性が確認された。マウスにおいて、A/Vietnam/1194/2004 由来の全粒子ワクチンは異なる clade の

A/Indonesia/6 感染に対し防御効果が示された。

(10)2007/08 年の北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎での A/H1N1Os 耐性変異 (H275Y) は 0.4%と低かった。

(11)データベースで過去 100 年のインフルエンザウイルスのアマンタジン耐性遺伝子について検討した結果、宿主による進化の違いが明らかになった。

(12)高病原性トリインフルエンザウイルスがヒトへ伝播可能とするレセプター認識変異を簡便に測定する基本技術を開発した。これにより、パンデミック発生を分子レベルで事前に監視できる可能性を得た。生体中のトリおよびヒトインフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖分子群の定量的測定技術を開発した。

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

G. 研究発表

Kamijuku H., Nagata, Y., Ichnose, T., Jiang X., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, Y., Hase, K., Ohno, Shimaoka, T., Tonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H., Seino,

K.: Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of  $\alpha$ -galactosylceramide which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 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., S t o h r, 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 1 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). *Biochem. J.* (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. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.

Hishinuma-Igarashi, I., Mizuta, K., Saito, Y., Ohuchi, Y., Noda, M., Akihama, M., Sato, H., Tsukagoshi, H., Okabe, N., Tashiro, M., Kimura, H. Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBov) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J. Infection.* (2009, in press)

Sriwilajaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Okada, H., Tashiro, M., Suzuki, Y. Inhibitory activity of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses. *Antimicrobial Agent. Chemother.* (submitted, 2009)

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Bray, M., Jones, S., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Ebola virus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J. Virol.* (2009 submitted)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	無
実用新案登録	無
その他	無

## 鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構

北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座 教授 喜田宏

**要旨:** H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染被害はアジアからヨーロッパ、アフリカ諸国にまで拡大している。このウイルスによるヒトの感染・死亡例も報告され、ヒトからヒトへの伝播能を獲得すれば、新型ウイルスとしてパンデミックを起こすことが危惧されている。鳥インフルエンザのサーベイランスによって、その制圧のための疫学情報のみならず、ヒトの新型ウイルスの出現予測のためにも有益な情報が得られる。本研究は、鳥インフルエンザの疫学情報を継続的に収集するためにグローバルサーベイランスを実施するとともに、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への感染機構を明らかにすることを目的とする。日本、モンゴルにおいて採取された渡りガモおよびハクチョウの糞便材料1,312検体から合計75株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらの分離株にはニワトリに対して高病原性のH5やH7亜型ウイルスは含まれていなかった。また、本年5月に北海道で斃死体として見つかった野生オオハクチョウからH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された。分離されたウイルスは、鶏やアヒルに致死的な病原性を示し、豚にも感染することがわかった。2004年に発生した高病原性鳥インフルエンザで斃死したニワトリから分離されたA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)は豚に感染しないが、このPB2遺伝子を豚インフルエンザウイルスA/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1)のそれに置き換えた遺伝子再集合ウイルスは、豚における増殖能を獲得した。

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からインフルエンザウイルスの分離を試みた。さらに分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。HAおよびNAの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、

これらのウイルス株のHA遺伝子の塩基配列を決定し、HA開裂部位のアミノ酸配列を解析した。

2008年5月、北海道の別海町および佐呂間町で野生オオハクチョウの斃死体が発見された。これらの臓器乳剤からウイルス分離を試み、分離されたウイルスの抗原性および遺伝子を解析した。さらに、このウイルスをブタに接種し、ブタに対する感染性と病原性を調べた。

2004年に山口県のニワトリから分離されたA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) [C/山口/04 (H5N1)株]は豚に感染しない(Isoda *et al.*, 2006)。そこで、豚インフルエンザウイルスA/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1) [Sw/北海道/81 (H1N1)株]との遺伝子再集合体を豚に接種し、鳥インフルエンザウイルスの豚における増殖に関与する分子機構の解明を目指した。

### C. 研究結果

野生水禽の糞便1,312検体から75株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH3、H4、H6、H7、H9、H10、H11に、NA亜型はN1、N2、H5、N6、

N7、N8、N9に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。

本年5月北海道の野生オオハクチョウの斃死体からH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された。分離されたウイルスは、遺伝子型2.3.2に区分され、2007年末に香港、また2008年始めに韓国で分離されたウイルスと近縁であることが判った。動物に実験感染を実施した結果、本ウイルスは鶏やアヒルに致死的な病原性を示した。また、本ウイルスを豚に経鼻接種したところ、鼻腔スワブからウイルスが回収された。

Ck/山口/04 (H5N1) 株とSw/北海道/81 (H1N1) 株を发育鶏卵に同時接種し、その漿尿液を豚に接種した。鼻腔スワブから回収されたH5N1ウイルスの遺伝子分節の由来を調べたところ、Sw/北海道/81 (H1N1) 株のPB2遺伝子を有するウイルスが豚における増殖能を獲得していた。本成績を確認するため、リバーシジェネティクス法を用いて、豚から回収されたH5N1ウイルスと同じ遺伝子分節を有するウイルスを人工的に作出し、豚に接種した。その結果、本ウイルスも豚で増殖した。以上の結果から、Sw/北海道/81 (H1N1) 株のPB2タンパクがCk/山口/04 (H5N1) 株に豚における増殖能を付与することがわかった。

#### D. 考察

鳥インフルエンザウイルスの豚における増殖性には、PB2タンパクが関与することが明らかになった。この成績は、HAやNAの亜型にかかわらず、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物に感染する可能性があることを示している。今後、PB2と宿主因子の相互作用を解析することによってインフルエンザウイルスの豚における増殖に与る分子機構を解明する予定である。

#### E. 結論

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

スの豚への感染機構が解明されつつある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Soda, K., Sakabe, S., Sakamoto, R., Imamura, T., Sakaguchi, M., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Saijo, K., Sawata, A., Hagiwara, J., Lin, Z., and Kida, H. (2008). Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch Virol* 153, 1685-1692.
- (2) Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawaoka, Y., Ogasawara, K., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.
- (3) Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M., Bai, G. R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008). H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37, 16-21.
- (4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Mweene, A., Tsuda, Y., Kishida, N., Bai, G. R., Kameyama, K., Isoda, N., Soda, K., Naito, M., and Kida, H. (2008). Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes* 37, 144-152.
- (5) Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamoto, M., and Kida, H. (2008). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* (in press).

- (6) Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., and Kida, H. (2008). Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci* 70, 557-562.
- (7) Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kishida, N., Isoda, N., and Kida, H. (2008). Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol* (in press).
- (8) Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26, 2127-2134.
- (9) Sawai, T., Itoh, Y., Ozaki, H., Isoda, N., Okamoto, K., Kashima, Y., Kawaoka, Y., Takeuchi, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2008). Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124, 155-165.
- (10) Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida, H. (2008). Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch Virol* 153, 2041-2048.
- (11) Soda, K., Sakoda, Y., Isoda, N., Kajihara, M., Haraguchi, Y., Shibuya, H., Yoshida, H., Sasaki, T., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., and Kida, H. (2008). Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn J Vet Res* 55, 93-98.
2. 学会発表
- (1) 「2008年北海道で発見された致死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡松正敏、迫田義博、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (2) 「インフルエンザウイルスのカモに対する病原性の分子基盤の解析」梶原将大、曾田公輔、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (3) 「鳥インフルエンザウイルスの病原性獲得メカニズムの解析」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (4) 「高病原性鳥インフルエンザウイルス Ck/Yamaguchi/7/04 (H5N1) のブタにおける増殖能獲得の分子基盤」迫田義博、Rashid Manzoor、野村直樹、津田祥美、岡松正敏、尾崎弘一、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (5) 「2008年北海道で発見された致死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡松正敏、迫田義博、吉田裕美、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第146回日本獣医学会学術集会 (2008年、宮崎)

H. 知的財産の出願、登録状況  
 予定なし。

ウイルスの宿主域決定要因と人への馴化機構、ウイルス病原性の分子基盤の解明

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所 教授

**研究要旨:**近年、ヒトから分離される H5N1 インフルエンザウイルスには、ヒトでの増殖過程で獲得したと考えられる変異が多数見受けられる。しかしながら、ヒトの間での流行が起きていないのは、感染・増殖する部位が肺の深部であり、上部気道で効率よく増えていないためと考えられる（ヒトで効率よく伝播するためには、くしゃみや咳で拡散されるために、比較的低温である上部気道で増殖する必要がある）。そこで、ヒトに感染した H5N1 ウイルスが、更にどの様な変異を獲得した場合、ヒトで効率よく伝播するように変化するかを調べるために、ヒトから分離された H5N1 ウイルスを正常ヒト気管支細胞で継代したところ、継代ウイルスは様々な変異を獲得し、ヒト気管支細胞にて高い増殖性を示すようになった。

#### A. 研究目的

近年、H5N1 インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が増加している。幸いヒト間での流行は起こっていないが、ヒトへの感染が繰り返されると、ヒトに適応し効率よく伝播するウイルスが出現する恐れがある。それゆえ、ウイルスがどの様な変異を獲得すると、ヒトで効率よく増殖し伝播するようになるか調べ、そのメカニズムを解明することは、今後分離される H5N1 ウイルスのリスク評価を行い、世界的大流行に対する事前策を講ずるためにも重要である。そこで、本研究では H5N1 インフルエンザウイルスがヒト呼吸器の正常細胞で効率よく増殖するためにはどのような変化が必要であるのかを調べた。

#### B. 研究方法

2004 年から 2007 年にかけて、ベトナムとインドネシアにて、カモ、ニワトリおよびヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスの正常ヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞における増殖性を調べた。更に、リバースジェネティクス法（プラスミドから人工的にウイルスを合成する方法）を用いて、NHBE 細胞でよく増えるヒト由来株と増殖性の低い鳥由来株の遺伝子交雑体を作製し、どの遺伝子が NHBE 細胞における増殖性に関与するか調べた。また、鳥由来株およびヒト由来株を NHBE 細胞で継代し、増殖性の向上に関与するアミノ酸変異を調べた。

#### C. 研究結果

NHBE 細胞での増殖性において、カモ由来株 < ニワトリ由来株 < ヒト由来株といった明確な傾向がみられた。ニワトリ由来株の中には、ヒト由来株と同程度の高い増殖性を示す株も存在し、一方、NHBE 細胞での増殖性が低い鳥由来株は、大半が継代途中で途絶えてしまったことから、過去に起きたヒトへの感染は、ニワトリ等に適応し、ヒトの細胞で増えやすくなったウイルスがヒトに感染していた可能性が示唆された。一方、淘汰されずに NHBE 細胞での増殖性が上昇した鳥由来株では、主にポリメラーゼ遺伝子に変異が生じていた。NHBE 細胞での継代過程において、異なるクレードに属するヒト由来の 2 株に共通して、宿主細胞のレセプターと結合するヘマグルチニン (HA) 遺伝子に同一の変異が起きていた。

#### D. 考察

本研究で、ヒト気管支上皮細胞で継代することにより、H5N1 ウイルスは様々な変異を獲得し、高い増殖性を示すようになることが明らかとなった。今後、継代過程で生じた変異が、どの様に増殖性の上昇に関与しているのか、そのメカニズムの解明が必要である。

#### E. 結論

今回得られた結果は、今後分離される H5N1 ウイルスのリスク評価に際し重要な知見となり得る。



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26:562-572, 2008.

Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: the use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 82:2486-2492, 2008.

Iwatsuki-Horimoto K, Hatta Y, Hatta M, Muramoto Y, Chen H, Kawaoka Y, Horimoto T. Limited compatibility between the RNA polymerase components of influenza virus type A and B. *Virus Res* 135:161-165, 2008.

Sakabe S, Sakoda Y, Haraguchi Y, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Saijo K, Sawata A, Kume K, Hagiwara J, Tsuchiya K, Lin Z, Sakamoto R, Imamura T, Sasaki T, Kokumai N, Kawaoka Y, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26:2127-2134, 2008.

Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y, Takeuchi Y, Kida H, Ogasawara K. Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124:155-165, 2008.

Marsolais D, Hahn B, Edelmann KH, Walsh KB, Guerrero M, Hatta Y, Kawaoka Y, Roberts E, Oldstone MB, Rosen H. Local not systemic modulation of dendritic cell S1P receptors in lung blunts virus-specific immune responses to influenza. *Mol Pharmacol*. 74:896-903, 2008.

Sugaya N, Tamura D, Yamazaki M, Ichikawa M, Kawakami C, Kawaoka Y, Mitamura K. Comparison of the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir against influenza virus infection in children. *Clin Infect Dis*.

47:339-345, 2008.

Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454:890-893, 2008.

Murakami S, Horimoto T, Mai LQ, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol*. 82:10502-10509, 2008.

Jia B, Shi J, Li Y, Shinya K, Muramoto Y, Zeng X, Tian G, Kawaoka Y, Chen H. Pathogenicity of Chinese H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in pigeons. *Arch Virol* 153:1821-1826, 2008.

Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Midon CA, Mai LQ, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26:6398-6404, 2008.

Li C, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* 82:11880-11888, 2008.

### 2. 学会発表

山田晋弥、伊藤睦美、坂井(田川)優子、高野量、堀本泰介、鈴木隆、鈴木康夫、河岡義裕「H5N1 インフルエンザウイルスの正常ヒト呼吸器上皮細胞における増殖性に関する変異」第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月28日

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）  
分担研究報告書

飛沫・飛沫核の拡散特性の解明に関する研究

研究分担者	岡部信彦	国立感染症研究所感染症情報センター長
研究協力者	井上 栄	大妻女子大学教授
	杉原義文	(株) 日建設計総合研究所主任研究員
	小原弘道	首都大学東京大学院理工学研究科助教

**研究要旨** 新型インフルエンザ発生時の対策の一つとして、咳患者のマスク着用を徹底することにより流行を遅らせ、かつ流行を小規模にさせることが考えられる。我々はすでに、1) 咳風速・風圧がマスクによって 1/10 以下になる、2) グリセリン・ミストで満たしたチャンパーに咳風を吹き込むことによって起こされるミストの動きを粒子画像流速計測法で解析すると、マスク使用によってミストの速度と流動範囲が抑制されることを明らかにしている。本年度の研究においては、ミストを吐出させる人工咳発生装置を開発し、それを使ってマスク着用の効果をより定量的に解析した。結果は、廉価で簡便な紙マスクを使っても、口近傍に誘起される流動の速度は非着用時の 3% に減衰し、飛沫核相当の粒子の飛散量も 8% と大幅に抑制された。マスクの着用により、口からの飛沫の拡散が低減することを定量的に示した。

**A. 研究目的**

新型インフルエンザは咳で広がる感染症である。したがって、容易かつ効果的な感染予防の第 1 段階として、マスク着用が重要である。とくに、感染者のマスク着用は感染源対策として、感染伝播抑制に大きな効果があると考えられる。しかしその重要性は認識されているものの、飛沫量・ウイルス量の測定が難しいことから定量的な解析が行われておらず、リスク評価をおこなう上でも重要な評価指標もない。

咳により口から飛散する飛沫は、流動によって広がり、液滴径に対応して沈降を示すものの、微小径の飛沫は流動とともに飛散し、1 m 以内にいる他の人に感染が起こる（飛沫感染）。さらに飛散した飛沫が空中で乾燥し飛沫核になると、沈降することなく室内を浮遊し、離れた所にいる人にも感染が起こる（飛沫核感染）、と考えられている。

これらの飛沫感染・飛沫核感染の対策のためには、咳による流動特性を評価する必要がある。さらに、マスク着用による飛沫・飛沫核の拡散制御効果を定量的に評価することは、マスク利用の促進、ならびに新しいマスク開発のための指針として大変重要である。

本研究では、人工咳装置(ACM)を開発し、咳流動を模擬し、マスク着用の効果を定量的に評価した。

## B. 研究方法

人工咳装置(ACM)を図1に示す。ACMは、シリンダ・ピストン、直動アクチュエータ、マネキン顔部で構成されている。シリンダ内にはグリセリン・ミストを入れておく。アクチュエータによりピストンを駆動し咳流動を形成させた。人工の咳は、成人男子の咳を模擬した。ただし、マネキン顔部の口は単純な開口部となっており、歯・唇・舌などは考慮しておらず、また鼻部からの流動もない。

画像計測手法としては、高速度カメラ(Motion Pro X3)により取得した微小時間間隔の2枚の粒子画像から速度場を得る粒子画像流速計測法(PIV: Particle Image Velocimetry)を使った。PIVによる二次元速度場計測ならびに二値化画像処理法により、飛沫に相当する極微小液滴粒子(数 $\mu\text{m}$ ~十数 $\mu\text{m}$ )の挙動・分布情報を計測した。

PIVとは、微小時間間隔で取得された画像情報を相互相関等により比較演算することにより移動距離をもとめ、それを画像の取得間隔時間をもとに速度情報を取得する手法であり、取得画像を格子分割することによって領域内の速度場情報を取得できる。

二値化画像処理法は、取得した画像情報

を二値化することで、飛沫核が分布する領域とそれ以外とに分離し、画素情報から飛沫核の飛散分布情報を評価できる。

実験条件は、咳流動速度条件を変化させ、速度分布特性、飛散・拡散特性を計測した。

マスクは、廉価で簡易な紙マスクから高価で性能の高いマスクまで、標準的に入手可能な数種類のマスクを用い、比較した。

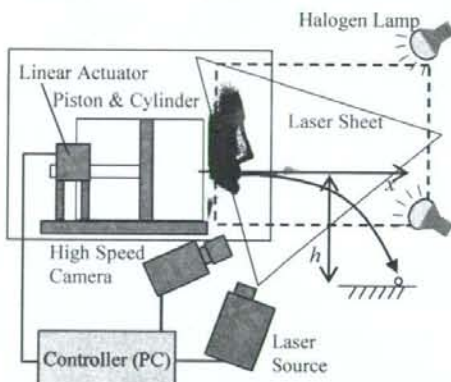


Fig. 1 Artificial coughing machine (ACM)

## C. 研究結果

図2は、ACMにより生成された咳流動をミスト分布によって可視化したものである。咳流動開始から(1) $t=0.04\text{s}$ 、(2) $t=0.12\text{s}$ における流動を示した。非常に短い時間に形成される咳流動を良く模擬している。ただし本実験では、口部において歯や唇などを考慮していないことから、人間からの実際の咳に比べてより単純化された直進性の高い流動が形成されている。図示は割愛(既報)するが、実際の人間の咳においては歯や唇などの影響により、流動は偏向し3次元性の高い流動が形成される。また、このマスク評価においては、咳流動の集中度合いが強くなるため、マスクにより負荷の高

い条件となり過大に流出量を評価する可能性がある。しかしながら、時間平均的にはほぼ同程度の咳流動が形成されており、瞬時の流動の差異の量も小さいと言える。また流出量を過大に評価することによって、より安全な評価が可能であると考え、とくに口部の細部は考慮せず実験を行った。



Fig. 2 Flow pattern of Artificial Cough

図3は、ACMにより形成される咳流動と実際の人間の咳の時間的な速度変化を、口部近傍で計測比較したものである。いずれの分布においても、咳流動形成から急峻な速度を有し、 $t=0.3s$ の間に流動は減衰する。また、いずれの最高速度も最大  $11m/s$  で同程度となっており、時間的な変化も人の咳を十分に模擬していると考えられる。以降では、この ACM を用いてマスク効果に関する実験を行った。

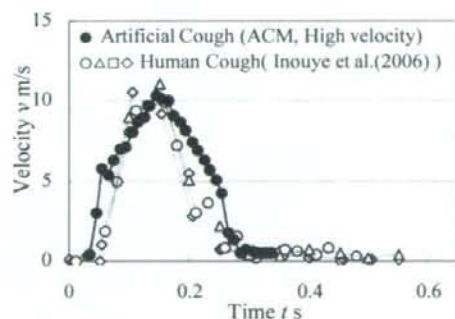


Fig. 3 Velocity of Coughing near Mouth

図4は、紙マスク (Mask B)着用時の口近傍部でのミストの流出様相と流出する速度ベクトル分布を示す。口近傍のミストが

流出している領域に対応して速度ベクトルが示されているが、その大きさは小さく最大でも  $0.3m/s$  程度となっている。マスク非着用時においては最大速度として  $U_p=11m/s$  を有していたこと(図3)と比較すると、その数%となっており、マスク着用によって大幅に速度も減少することがわかる。



Fig. 4 Velocity Distribution with Mask [(B)Paper Mask,  $U_p=11 m/s$ ]

図5は、人工咳装置によって形成された咳流動と、マスク着用時の様相の一例 (b)Mask B 紙マスク、(c) MaskD 立体型マスク)を示したものである。図中の数値は、画像計測から得られた飛沫核に相当する極微小粒子の飛散量を、マスク非着用時に流出する量により正規化した値である。マスクによりその性能に差異はあるものの、マスク未着用時に比べその拡散領域は著しく減少し、その量は廉価な紙マスクでも8%になり、立体形状マスクでは計測精度もふまえるとほとんど抑制されている。また、前述の結果と同様にいずれのマスク着用によっても、咳によって口近傍に誘起される流動速度もはるかに抑制され、マスクの着用により大幅に飛沫などの拡散を低減することが可能であると考えられる。