

Fig. 5 Efficacy of Wearing Mask

D. 考察

人工咳装置を用いた実験により、人間を使っては難しいマスクの定量的な評価を行うことが可能になった。これらの結果から、安価な紙マスクでも流速を 1/100 以下に低減し、流出する飛沫核相当のミストの拡散領域も大幅に狭めることができることが明らかにされた。このことから、たとえば、多くの家庭や学校、医療機関などの備蓄にあわせて、国民全員分のマスクを備蓄しておき、新型インフルエンザ発生時に、即座に配布着用を義務づけることにより、ウイルス拡散が大幅に抑えられ、流行を遅らす

ことが期待できる。

マスクでウイルスの広がりを完全に遮断することができなくても、感染の基本再生産数 R_0 を抑え流行を遅らせることで、社会の混乱を防ぎ、ワクチン製造までの時間を稼ぐことが可能となると考えられる。

E. 結論

人工咳により形成される流動特性を示し、マスク着用による流動抑制効果を定量的に示した。新型インフルエンザ発生時に咳患者に廉価なマスクの着用を積極的にすすめることで、飛沫の拡散が抑えられ、流行を効果的に抑制することができると考えられる。

G. 研究発表

[学会発表]

Obara H, Yamada K, Sugihara Y, Tashiro S, Okabe N, Inouye S : Transport Characteristics of Droplet Generated by Coughing, 7th JSME/ KSME Thermal Fluids Engineering Conference (Sapporo, Japan 2008)

小原弘道、杉原義文、田代伸一、岡部信彦、井上栄：マスク着用効果の人工咳装置による評価。第 37 回 日本医療福祉設備学会、2006 年 11 月、東京。

井上栄、岡部信彦、小原弘道、杉原義文：咳風圧の測定：マスク着用効果の評価。同上学会。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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 国立感染症研究所 感染症情報センター長
研究協力者 山寺静子他 5 名 同上協力研究員

研究要旨 新型インフルエンザ等感染症に関する外部からの問い合わせに対して電話相談窓口を設置し、対応を試みた。電話回線は、情報センター内に本相談専用に使え回線を新たに設置した。

2009 年 1 月から 3 月までに電話相談窓口寄せられた新型インフルエンザ等に関する問い合わせ内容を解析し、迅速に正確な提供するための検討をした。感染症全般に関する問い合わせが多く、予防接種に関連する者が最も多かったが、インフルエンザに関しては、総相談件数は 49 件であった。相談内容：インフルエンザの治療薬、予防薬（タミフル、リレンザ等）に関する質問が 13 件で最も多く、ワクチン（7 件）、プレパデミック（5 件）、鳥インフルエンザ（5 件）、ガイドライン（4 件）、集団発生の予防法（3 件）、学級閉鎖、保育園の登園許可（3 件）、についての質問があった。そのほか、脳炎、診断キット、流行株、授乳についての問い合わせが寄せられた。相談者の地域別：東京が最多で神奈川、青森、埼玉。茨城が多く北海道、東北を除く各県から相談が寄せられた。

年齢別相談状況：30 代（13 件）、40 代（10 件）、50 代（9 件）、60 代（4 件）、20 代（3 件）の順であった。

A. 研究目的

電話相談窓口は直接的で簡便で即答を得られる方法であるため緊急時でも早い対応が可能であるため、その内容を解析し、有効な発信方法を検討した。

B. 研究方法

電話相談は 2009 年 1 月から 3 月まで行った。対応は月曜から金曜日の午前 9 時半から午後 5 時まで受け付けた。相談員は国立感染症研究所の OB でウイルス感染症の専門家が当たった。開始前には、感染症情報センタースタッフと、これまでの相談内容あるいは想定質問に関しあらかじめミーティングを行ない、スタッフとの意見等と齟齬を来さないようにした。また極めて専門的な内容あるいは回答に困難を来す時は、適時情報センタースタッフと意見交換をするようにした。

電話対応には、質問内容、日時、居住地、回答内容、回答者名を記入する記録用紙を使用した。

C. 研究結果

*相談内容は主として予防、治療薬、ワクチン、プレパデミック、鳥インフルエンザ、ガイドライン、集団発生予防と学校、保育園の流行拡大防止について寄せられた。

このことから新型インフルエンザ予防対策に深い関心を示していることがわかった。

*月別相談数は 2 月、3 月、1 月の順であった。これは相談の担当期間が 2009 年 1 月から 3 月までで前年の 11 月、12 月を除くデータであるため正確な傾向がつかめなかった。

*地域別相談数では東京が最多で神奈川、青森、埼玉、茨城の順であったが北海道、東北からの相談はなかった。これも相談対応期間

が短いために傾向がつかめなかった。

*年齢別にみると 30 代、40 代、50 代、60 代、20 代の順であった。これは保健医療機関の現役の人からの相談であるため中年が多くなっていると思われる。

*なお現在のところ、外部に対してこの窓口の存在を広く公表しているのではなく、情報センターに寄せられる外部からの質問（除く、メディアおよび行政対応にかかわるもの）への対応としている。

*情報センター内窓口として試みにスタートしたのでまだ小規模であるが、これまで経験から、何かしらの問題点があった時には問い合わせが急増する可能性がある。それに備えて、十分とはいえないまでも対応の充実等を図って行く予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

インフルエンザワクチン有効性評価法の開発

研究分担者	高橋宜聖	（国立感染症研究所免疫部）
研究協力者	小野寺大志	（国立感染症研究所免疫部）
	小林和夫	（国立感染症研究所免疫部）
	小田切孝人	（国立感染症研究所ウイルス第3部）
	田代真人	（国立感染症研究所ウイルス第3部）

研究要旨 HI試験や中和試験に基づいたインフルエンザワクチン有効性の評価は、近年様々な問題点が指摘されており、生体内での感染防御能をより反映した評価法の導入が望まれている。本研究では、ヒト血清ならびに末梢血リンパ球を移入したマウスを作製し、マウス生体内においてインフルエンザウイルスに対するヒト液性免疫応答の構築を試みた。平均値レベルの抗ヘマグルチニン血中抗体を有するドナーから末梢血細胞を調製し、ヒト細胞の生着に優れたNOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに移入した。このマウスにH1N1不活化全粒子ワクチンを接種したところ、ヘマグルチニン特異的なヒト抗体産生応答が再現された。さらにヒト血清抗体を移入したマウスでは、H1N1ウイルスに対する抵抗性が賦与されることが明らかとなった。本実験系の改良により、インフルエンザワクチン接種者の感染防御能をより正確に測定することが可能になり、プレバンデミックワクチンへの利用が期待される。

A. 研究目的

インフルエンザワクチン接種者の感染防御能をより正確に測定するため、ヒト血清ならびに末梢血細胞を移入した免疫系ヒト化マウスを作製した。このマウスを用いて、ドナー由来液性免疫の感染防御能の評価を試みた。

B. 研究方法

(1) ヒト血清ならびに末梢血細胞の調製

季節性インフルエンザワクチン接種前のボランティア（年齢 21-55 才、男 / 女 = 6 / 2）からヘパ

リン含有、非含有末梢血を採取し、ヘパリン非含有末梢血から抗血清を調製し、ヘパリン含有末梢血からフィコール遠心分離により末梢血単核球を分離した。

(2) ELISA によるヘマグルチニン（HA）特異的抗体価の測定

バキュロウイルス発現系にて A/PR/8/34 (PR8)の組換え HA タンパクを作製した。rHA タンパクを ELISA プレートにコーティングし、1% BSA でブロッキング後、段階希釈したヒト血清を加え、ペルオキシダーゼ標識した抗ヒト IgG1 抗体で検出

した。

(3) 不活化ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

ヒト末梢血細胞 (1×10^7 個) を NOD/SCID/Jak3^{-/-} マウス尾静脈に移入後、不活化 A/New Caledonia/20/99 (NC20) を接種した。10 日後に、脾臓を摘出し、NC20 rHA に特異的な抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて計測した。

(4) インフルエンザウイルス感染実験

ヒト血清 500 μ l を CB17-SCID マウスの腹腔内に注入した。翌日、5 LD50 の PR8 株を経鼻感染させ、3 週間にわたり体重減少と生存率を観察した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会の承認を得てから行い、ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得てから行った。

C. 研究結果

(1) ヒト血清中に含まれる抗 HA 抗体価の測定

8 名のボランティアから血清を採取し、HI HA (PR8) に結合する IgG1 抗体価を ELISA 法で測定した (図 1)。その結果、ドナー間で 10 倍以上の抗体価の相違のあることが明らかとなった。

(2) 不活化ワクチンに対するドナー由来液性免疫応答の測定

平均値レベルの抗体価を示した二人のドナー由来末梢血リンパ球を NOD/SCID/Jak3^{-/-} マウスに移植した。不活化 NC20 ワクチンをこのマウスに接種後、脾臓における NC20 rHA に特異的な抗体産生細胞の数を測定した (図 2)。すると、2 人の

ドナーのどちらの細胞を移植したマウスでも、NC20 特異的な IgG 抗体産生細胞が検出された。さらに、IgG サブタイプを調べると、IgG1 と IgG3 から構成されることが判明した。

(3) ヒト血清を移入したマウスの感染防御能の測定

血清中に産生される抗体の感染防御能を調べるため、抗 HA 抗体価が平均値レベルのヒト血清と、抗 HA 抗体価が最も低い血清をマウスに移入した。これらのマウスに致死濃度の PR8 を経鼻感染後、体重減少と生存率の変化を観察した。その結果、抗 HA 抗体価が平均値レベルの血清を移入したマウスでは、体重減少が抑制され、生存率も有意に増加することが明らかとなった。これに対し、抗 HA 抗体が低い血清では、有意な感染防御効果を観察することはできなかった。

D. 考察

現在国家備蓄されている H5N1 型プレバндеミックワクチンのシードウイルスは、高病原性鳥インフルエンザウイルスの HA (改変型) と NA を使用する。そのため、他の鳥インフルエンザウイルスと同様、哺乳動物の抗体価を測定する場合、HI 試験の感度が著しく低下する。さらに、細胞傷害の阻害を指標とした中和抗体価も生体内での感染防御能と相関しない例が報告されており、H5N1 型プレバндеミックワクチン有効性を評価する新しい技術開発が望まれている。本年度の研究で、ヒト液性免疫を構築したマウスを作製することに成功した。この実験システムは、従来の *in vitro* 法と異なり、*in vivo* 免疫反応を指標とすることが大きな改良点である。そのため、従来法では不可能であった様々な *in vivo* 因子を包含した状態における評価が可能となり、感染防御能のより正確な評価につながることを期待される。今後、

このシステムの感度・正確性を詳細に検証した上で、プレパンデミックワクチンの有効性評価へ適用可能かどうか検討する予定である。

最近我々は、プレパンデミックワクチンを接種したマウスを用い、中和抗体の感染防御機序を解析した結果、抗 HA 抗体と抗ノイラミニダーゼ (NA) 抗体が相乗的に機能することを明らかにした。今後、プレパンデミックワクチン接種者において、抗 HA 抗体と抗 NA 抗体価の血中濃度を測定し、感染防御における抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の役割の解析を検討している。

E. 結論

インフルエンザウイルスに対するヒト液性免疫応答を再構築したマウスモデルを作製し、ヒト感染防御能を生体内で評価することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, M., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* in press, 2009

2. 学会発表

[国内学会発表]

(第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月)

- (1) 高橋宜聖、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38回日本免疫学会、京都、2008年12月)

- (2) 高橋宜聖、小野寺大志、加地友弘、北村弘、竹森利忠、小林和夫「IgA+ memory B cells persist in the lung after an intranasal infection with influenza virus」

- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図1 ヒト血清中に含まれる抗 HI HA IgG1 抗体価の比較

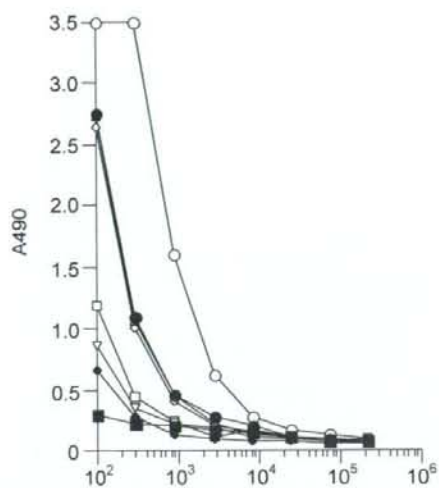


図2 マウスに移植したヒトリンパ球の抗 HI HA 抗体産生応答

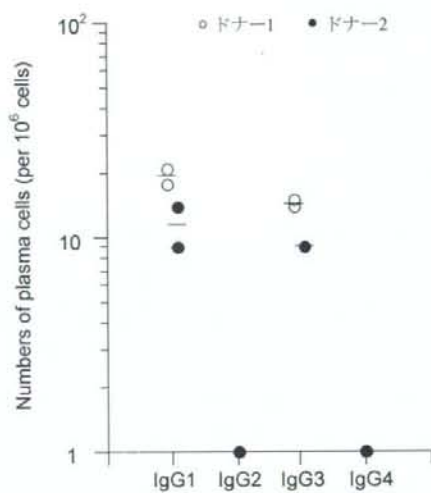
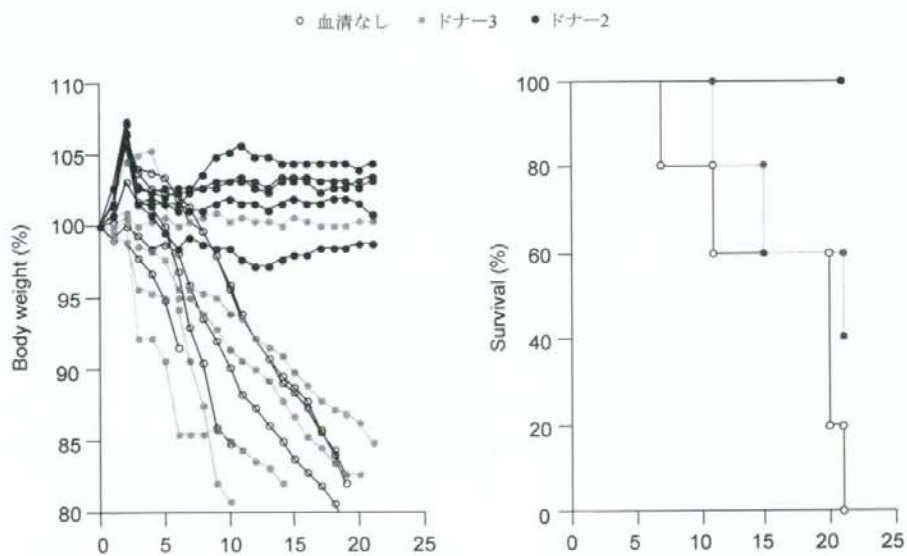


図3 ヒト血清を移入したマウスの感染防御能



新型インフルエンザウイルスの感染予防法の開発

研究分担者 長谷川秀樹 (国立感染症研究所 感染病理部)

研究協力者 相内章、田村慎一、佐多徹太郎 (同所、感染病理部)

田中伸哉 (北海道大学大学院医学研究科病理学講座)

研究要旨 新型インフルエンザはかつてヒトが経験した事のないインフルエンザウイルスにより引き起こされるインフルエンザであり流行ウイルスに対してヒトが免疫を持っていない事が大流行につながる原因と考えられる。本研究では新型インフルエンザウイルスの流行に備えて感染時と同様の粘膜での免疫を前もって準備しておく手段としての粘膜免疫誘導の為に安全なアジュバント開発を目的とした。免疫修飾物質として天然物由来のキノコ菌糸体抽出物のアジュバント作用について検討を行った。12種類中4種類の菌糸体抽出物において抗原特異的鼻腔洗浄液中 IgA 抗体、血清 IgG 抗体応答が認められ抗原特異的 T 細胞応答も認められ致死的なインフルエンザウイルス感染を防御した。高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 由来の NIBRG14 全粒子ワクチンを用いた実験では *Phellinus linteus* 由来菌糸体抽出物と共に経鼻接種する事により clade の異なる A/Indonesia/6/2005 ウイルス感染に対し防御効果が示された。天然物由来のキノコ菌糸体抽出物が安全なアジュバント候補になりうる事が示された。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパ、アフリカにまで広がりヒトに感染した場合に高い致死率をしめしている。本ウイルスがヒトからヒトへ伝播する新型インフルエンザの元となると危惧される新型インフルエンザ出現の脅威となっている。新型インフルエンザはヒトが今まで感染の経験をしていない為に大流行する事が危惧されている。その為感染前に感染による免疫と同様の免疫を準備する事により大流行を阻止する事が可能であると考えられる。その方法として経鼻インフルエンザ

ワクチンがあるが不活化ワクチンにより効率よく粘膜免疫を誘導する為には安全で効果的な粘膜アジュバントが必要である。安全でより効率のよい粘膜免疫誘導方法を調べる目的で免疫修飾物質として天然物由来のキノコ菌糸体抽出物のアジュバント作用について検討を行った。キノコ類には多くの Glucan が含まれ真菌をターゲットとした自然免疫系の活性化が期待される。その自然免疫活性化機構を利用して哺乳類での病原性を解析しその有効な予防法を開発しそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

材料と方法:

ウイルス株及びワクチン株

インフルエンザウイルス株 A/VN/1194/2004(H5N1)、及び A/PR8(H1N1) を用いてマウス感染実験を行った。また交叉防御の実験では A/PR8(H1N1) のスプリットワクチンを用いた。H5N1 のワクチン株としてはリバースジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1) の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

ウイルス感染

A/VN/1194/2004 (H5N1) 株 及 び A/PR8(H1N1) ウイルスを 1,000pfu を鼻腔内に接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL2 及び BSL3 動物実験施設でおこなった。

アジュバントの調整

経鼻粘膜ワクチンのアジュバントとして以下 12 種のきのこの熱性抽出物を用いた。

Phellinus linteus, *Cordyceps militaris*,

Lyophyllum decastes, *Macrolepiota gracilentia*,

Naematoloma sublateralium, *Agaricus blazei*,

Grifola frondosa, *Ganoderma lucidum*,

Hericium erinaceum, *Inonotus obliquus*,

Lentinula edodes, *Pleurotus nebrodensis* (応用きのこ研究所、山梨県韮崎市) 陽性対照として合成二本鎖 RNA である poly(I:C) (東レ株式会社) をもちいた。

マウス

免疫実験及び感染実験に用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウス (メス) を用いた。

免疫方法

6~8 週齢の BALB/c マウス (雌) を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 0.1 ~ 1 μ g のワクチンを 10 μ g のきのこ熱性抽出物アジュバント、と共に経鼻投与した。4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織 (NALT) および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

ELISA アッセイ

遺伝子を改変した H5HA 及び H1HA に対する IgA および IgG 抗体価の測定は、ELISA にておこなった。免疫に用いたワクチン抗原を ELISA プレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgA (α 鎖) または IgG (γ 鎖) を反応させた。アルカリホスファターゼ-ストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ吸光度を測定した。あらかじめ精製した H5-HA, H1-HA 反応性の IgA と IgG を任意の単位 (160U) のスタンダードとして用い、2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

C. 結果

1、インフルエンザスプリットワクチンと

キノコ熱性抽出物の経鼻投与による局所及び全身性の抗体応答

経鼻インフルエンザワクチンの粘膜アジュバント効果を12種のキノコ熱性抽出物を用いて調べた。BALB/cマウスに1 μ gのHAワクチンと様々なアジュバントと共に経鼻接種してその効果を調べた。キノコ12種 (*Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Lyophyllum decastes*, *Macrolepiota gracilentia*, *Naematoloma sublateritium*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceum*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus nebrodensis*) 由来の熱性抽出物を調べたところ、*Phellinus linteus* (PL), *Macrolepiota gracilentia* (MGR), *Grifola frondosa* (GF), *Lentinula edodes* (LE)-adjuvanted をアジュバントに用いたワクチン群で鼻腔洗浄液中のHA特異的IgA抗体及び血中のHA特異的IgG抗体の応答が認められた。(図1)

2. キノコ熱性抽出物アジュバント併用経鼻ワクチンによるインフルエンザ肺感染の防御

次に抗体応答が見られたキノコ熱性抽出物アジュバントとインフルエンザのスプリットワクチンの経鼻接種により致死的なインフルエンザ感染が防御可能かどうかをウイルスを肺に感染させるモデルを用いて調べた。*Phellinus linteus* (PL)抽出液をアジュバントとして用いて経鼻接種したマウスにおいて陽性対照である合成二本鎖RNA poly(I:C)をアジュバントに用いた時と同程度の肺洗浄液及び血清中のHA特異的IgG抗体が検出された。この群においてはA/PR8の肺感染モデルで感染3日目のウイルス価において5匹中4匹ではウイ

ルスが同定されず感染の阻止が認められた。

Macrolepiota gracilentia (MGR)及び*Lentinula edodes* (LE)の熱性抽出物をアジュバントに用いてワクチンを経鼻投与した群においては部分的な感染防御が認められた。

これらキノコの熱性抽出物をアジュバントとした経鼻ワクチンの感染防御能を調べる目的でそれぞれのワクチン接種後に致死量(40 LD₅₀)のA/PR8 virusを感染させ体重変化と生存を調べた。PL又はpoly(I:C)をアジュバントに用いたワクチンを経鼻接種した後に感染を行った群のマウスでは感染後14日に渡って体重変化が見られなかった。それに対しMGR, GF, LEの熱性抽出物を用いた群においては体重が感染7日目まで次第に減少していった。対照群としてアジュバント無しのワクチンを経鼻接種した群においては7日まで著しい体重減少が認められた。感染後14日目までの生存率を調べるとPLアジュバント及びPoly(I:C)アジュバントと共に接種した群は100%生存しPLアジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンがpoly(I:C)と同等に致死肺感染からの感染防御が示された。一方MGR-, GF-, LE-アジュバントワクチンの場合生存率は40から60%に留まり部分的な防御であった。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル3病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

D. 考察

インフルエンザウイルスの感染予防では感染部位である上気道粘膜に粘膜免疫を誘導する事が重要である。しかしインフルエンザのスプリットワクチン単独で経鼻接種しても免疫応答はえられない。免疫を刺激するアジュバ

トが必要である。我々はいままで合成二本鎖 RNA を用いて粘膜免疫を誘導するアジュバント作用を示してきた。今回天然物であるキノコの熱性抽出物に粘膜アジュバント作用がある事を示した。キノコには β -Glucan が豊富に含まれており真菌感染の信号として dectin-1 に認識される事が知られている。インフルエンザのスプリットワクチンと抽出液を経鼻接種する事でこれらの病原体認識機構が働き粘膜免疫誘導がなされた事が考えられる。今回 12 種のキノコを用いて調べたところ特に粘膜アジュバント作用が強いものとして *Phellinus linteus*(PL)が見つかった。このキノコ由来の抽出物を用いると致死的な感染に対しても完全感染防御がみられた。今後、いままで見いだされた粘膜アジュバント等との併用等により安全で効果の高い経鼻ワクチンができるものと期待される。

E. 結論

キノコ由来熱性抽出物のうち *Phellinus linteus*(PL), *Grifola frondosa* (GF), *Lentinula edodes* (LE)に高い粘膜免疫活性の作用が認められた。これらをインフルエンザスプリットワクチンと共に経鼻接種する事により致死的なウイルス感染を防御する事が可能であった。ここで誘導される粘膜免疫には強い交叉防御効果が期待できるため、株の型の予測が不可能な新型インフルエンザ対策への応用が考えられる。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 2008 Jun;172(6):1625-37.
2. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5. *corresponding author
3. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Nov;7(9):1435-45.
4. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Therapeutic and Clinical Risk Management* 2009, in press.
5. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires

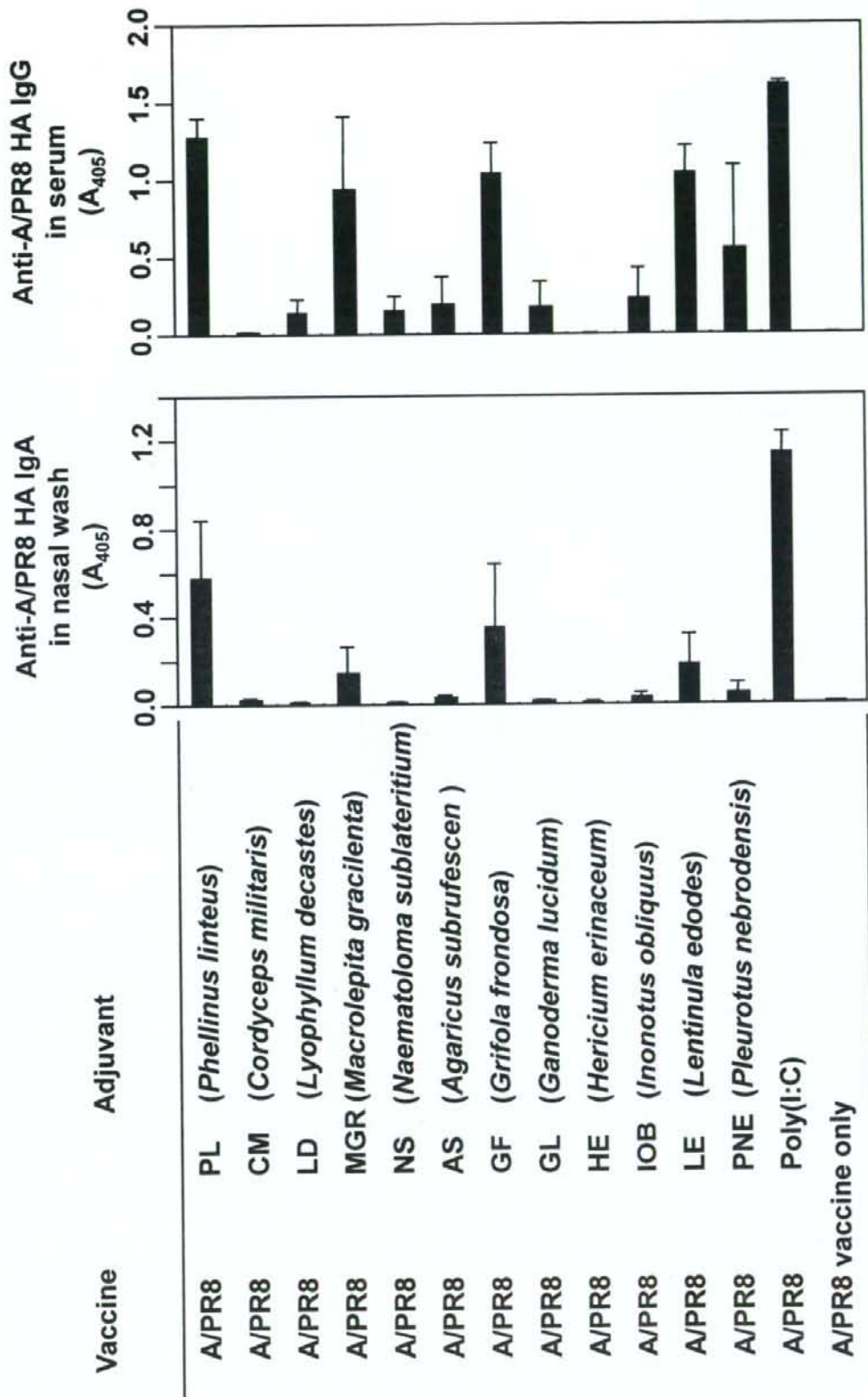
both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. **J Infect Dis**, in press.

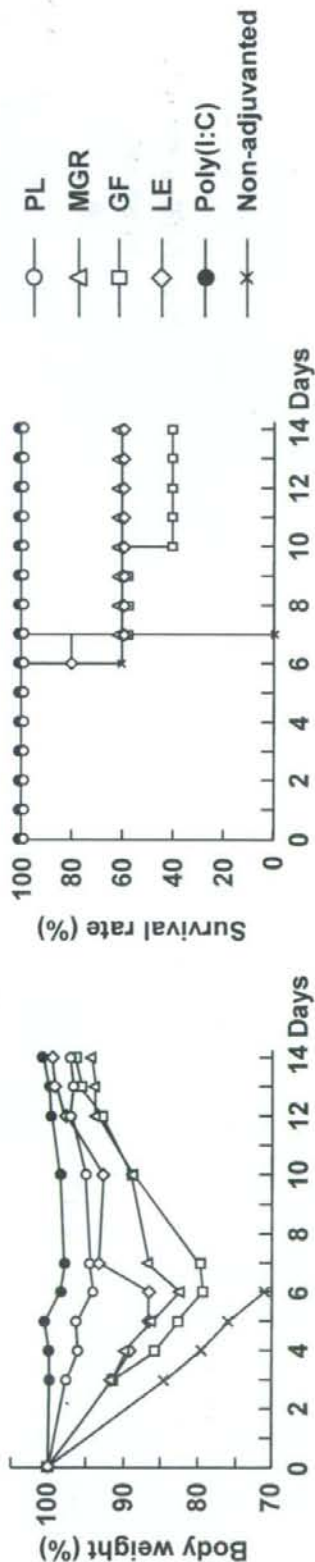
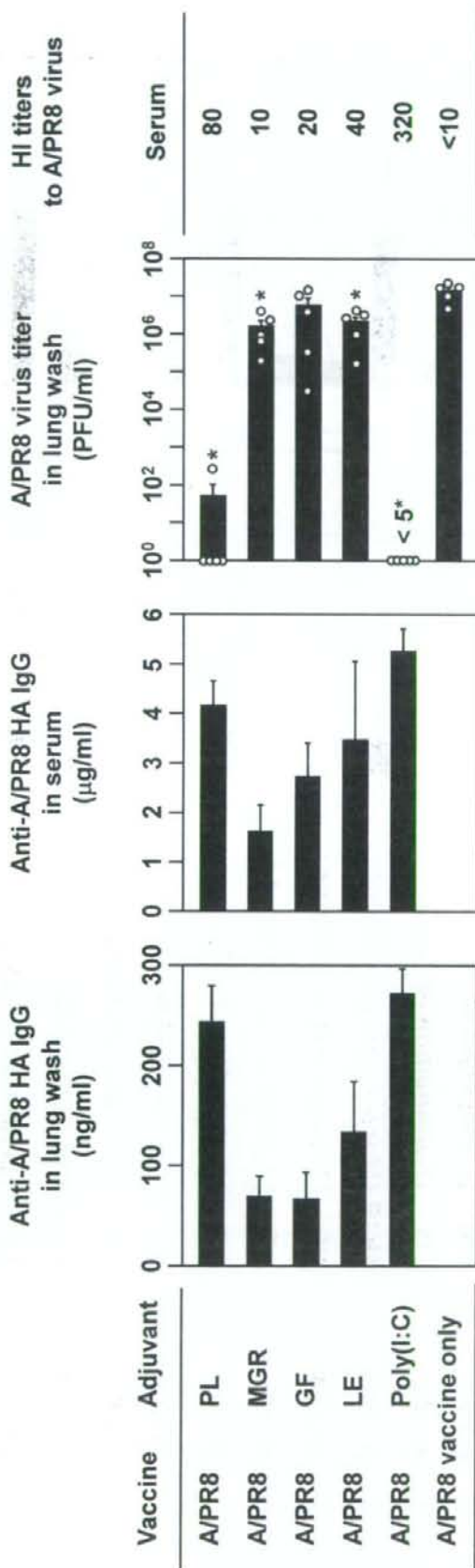
2. 学会発表

1. 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総会（岡山）2008 年 10 月
2. 相内 章、一戸猛志、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進。第 56 回日本ウイルス学会総会（岡山）2008 年 10 月
3. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討。第 56 回日本ウイルス学会総会（岡山）2008 年 10 月
4. 長谷川秀樹、一戸猛志、網 康至、永田典代、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学術集会（熊本）2008 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
なし
2. 実用新案登録 なし





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

研究分担者 西藤岳彦

(独) 農業・食品産業技術研究機構 動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム

研究協力者 鈴木 宏、齋藤 玲子、鈴木康司

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染症学講座 公衆衛生分野

研究要旨 世界的なノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現を受けて、わが国におけるノイラミニダーゼ耐性株の出現頻度を調査するため、2007/08 インフルエンザシーズンに国内 6 県 14 医療施設でインフルエンザと診断を受けた患者から分離されたウイルスについて、ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性を検討した。治療後の検体からウイルスが分離されたものについては、治療前後における感受性の変化。またを検討した。今回の解析では、ノイラミニダーゼ阻害剤 2007/08 シーズンにおける耐性株の分離頻度は低いものであり、ノイラミニダーゼ阻害剤投与による耐性獲得率の低いことが示された。

A. 研究目的

2007/08 年シーズンにおいては、ヨーロッパを中心に AH1N1 亜型インフルエンザウイルスにおけるタミフル耐性株の出現が幅広く認められた。特に、当該シーズンに最初にタミフル耐性株の出現を報告したノルウェーでは、AH1N1 亜型分離株の 60%以上が耐性株であることが報告されており、フランスでは 47%、カナダで 25%、アメリカ合衆国でも 11%と高い頻度で耐性株が循環していたことがわかっている。既存の抗インフルエンザ治療薬のうち、アマンタジン耐性株の流行も知られており、ノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) に対する耐性株の出現、流行が広がることは、高インフルエンザ治療薬の効用が著しく減弱することを意味する。さらに、現在出現が危惧されている新型インフルエンザウイルスによる大流行 (パンデミック) 発生時に、健康および社会的被害を低減させる為には新型用ワクチンや NAI の使用が検討されている。しかし、このような新型ウイル

スが、NAI 耐性型の N1 ノイラミニダーゼ (NA) を持った形で出現すると、新型インフルエンザ対策に一部が大きく損なわれることとなる。このため、現在広まっている AH1N1 亜型インフルエンザウイルスの出現機序や流行規模を正確に把握することは大変重要である。

本研究ではヨーロッパを中心に広く認められたタミフル耐性株の国内での浸潤状況を把握するため北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎の一般医療機関をインフルエンザで受診した患者から分離された AH1N1 亜型インフルエンザウイルスについて、耐性株の頻度を解析した。AH1N1 亜型耐性株の基準として NA タンパク質における 275 番目のヒスチジン (H) からチロシン (Y) への変異と NAI タミフル活性体 (GS4071) およびザナミビア (一般名: リレンザ) の NA 活性 50%阻害濃度 (IC50) の変化に着目して、変異株を同定した。また、薬剤治療の耐性出現への影響を検討するため、治療後にウイルスの分離さ

れた48例について、耐性の獲得の有無を解析した。

B. 研究方法

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生分野において2007/08インフルエンザシーズンにインフルエンザ感染により北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎の一般医療機関を受診した患者を対象とし、ウイルス分離を行った。また、再診に訪れた患者からのウイルス分離も行った。

分離されたAH1N1亜型インフルエンザウイルスの、ノイラミニダーゼおよびM遺伝子の塩基配列を決定し、NA阻害剤およびアマンタジンに対する感受性マーカーの有無を検討した。

分離ウイルスについては、同様にノイラミニダーゼ阻害剤であるタミフル活性体(GS4071)およびリレンザのノイラミニダーゼ活性50%阻害濃度は、蛍光基質2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)を用いた蛍光測定法によって測定した。陽性対照として、A/Texas/36/91(H1N1)親株およびH274Y変異株を用いた。

C. 研究結果

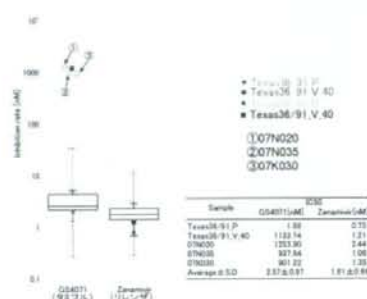
初診時検体における耐性株の出現頻度：

2007年12月～2008年4月の期間、北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎の14医療施設にインフルエンザ用疾患を訴えて受診した患者から、AH1N1亜型インフルエンザウイルス675株を分離した。

NA遺伝子およびM遺伝子の塩基配列の決定とそれに基づく推定アミノ酸配列を決定して、NAタンパクについてはH274Yの変異、M2タンパクについては既知の複数のアマンタジン耐性に関与するアミノ酸変異の検索を行ったところ、3株について(0.4%)H274Yの変異が認められた。また、アマンタジン耐性変異株と感受性株の割合は422:253で、全体の

63%がアマンタジン耐性株であった。3株のH274Yは、兵庫県から1株、長崎県から2株分離された。これらNAI耐性株はすべてアマンタジン感受性であった。

分離株について、NAIアッセイを行ってタミフル活性体およびリレンザに対するIC50を求めたところ、H274Y変異を持つ3株は予想通り高いIC50値を



図・表1 治療前検体から分離されたウイルスのノイラミニダーゼ阻害試験の結果

示すことが明らかになった(図・表1)。

図よりあきらかなようにH274Yの変異を持つ3株07N020, 07N035, 07K030はともに既知のNAI耐性株であるTexas/36/91のH274Y変異株であるTexas/36/91_V_40と同様にタミフル活性体に対して高いIC50値を示した(Texas/36/91_V_40; 1.1 μM, 07N020; 1.2 μM, 07N035; 0.9 μM, 07K030; 0.9 μM)。一方これらのウイルスのリレンザに対するIC50値には有意な変化は認められなかった。

これらのウイルスが分離された患者に関する治療効果については、一例の再診例に限られるが、薬剤服用から解熱(37.5度以下)するまでに60-72時間かかった事がわかった。通常、タミフル処方から解熱までは平均48時間といわれており、解熱時間が延長しているように認められた。

ノイラミニダーゼ阻害剤服用後耐性株の発生頻度：

NAI服用後の耐性株の発生頻度を求めるため、タミフル服用患者38例、リレンザ服用患者10例について服用後の検体からウイルスを分離して、耐性株の出現を検討した。

その結果、タミフル服用患者一例の服用4日後の

検体から耐性株 (07K316-2) の出現が認められた。この株のタミフルに対する IC50 は、584nM であったが、リレンザに対する IC50 の変化は認められなかった (図2)。

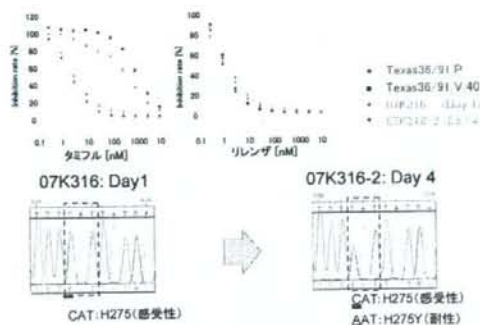


図2: タミフル服用後発生した耐性株の解析

シーケンスの波形情報からあきらかなように (図2)、07K316-2 は、NA タンパクの 275 番目のアミノ酸をコードするコドンの一番目の塩基が、C と A の混合であり、それぞれの場合感受性のヒスチジン、耐性のチロシンに翻訳される。このウイルスが分離された患者においては、解熱時間の延長は認められなかった。

D. 考察

全国6道府県14医療施設を対象にした調査によって、2007/2008 インフルエンザシーズンにおけるわが国での AH1N1 亜型インフルエンザウイルスの NAI 耐性株の出現頻度が、欧米に比べ比較的低レベルであったことが明らかになった。わが国は、世界有数の NAI 消費国であり、NAI 耐性株の出現の可能性が最も高いと考えられていたが、これまでの耐性株の流行様式や今回の調査の結果を考えると、NAI 服用という選択圧と耐性株の出現、流行頻度は一致せず耐性株の出現、流行が NAI 利用の選択圧のみでは説明しきれないことを示唆している。このことは、これまでの我々の調査や、今回の調査でも示されてきたように、NAI 治療後の耐性株の出現頻度が決して高くないこととも一致する。NAI 耐性株の出現と流

行の機序の解明には、疫学的情報のみならず、耐性株と野生株のウイルス学的な比較も重要であろう。

今回の調査で示されたように、幸いにもわが国で分離された耐性株はもう一方の抗インフルエンザ治療薬であるアマンタジンには感受性であった。しかしながら、アマンタジン感受性と NAI 耐性のリンクに生物学的必然性があるか否かは不明であり、今後アマンタジン、NAI 両薬剤耐性のウイルスの出現には十分注意する必要がある。

E. 結論

2007/08 シーズンにおける治療前タミフル耐性 H1N1 は調査地全体で 1% と低頻度であった。

NAI 治療後の耐性株は、リレンザ服用後では検出されず、タミフル服用後から 1 例検出された。

治療前から耐性株が検出された患者の解熱時間はこれまで報告されている結果より延長していることが示された。一方タミフル服用後に耐性株が検出された患者では解熱時間の延長は認められなかった。

F. 健康危機情報 特記事項無し。

G. 研究発表

学会発表

第 56 回日本ウイルス学会学術集会

鈴木康司ほか「2007/08 シーズンのノイラミニダーゼ阻害剤耐性 H274Y 変異 A/H1N1 インフルエンザウイルスの発生」2008 年 10 月

日米医学・急性呼吸器疾患部会

Reiko Saito et al. "Circulation of oseltamivir resistance influenza A/H1N1 in Japan"

2009 年 2 月

第 83 回日本感染症学会

鈴木康司ほか「本邦 6 地域におけるオセルタミビル耐性 H275Y 変異 A/H1N1 インフルエンザウイルス発生頻度」2009 年 4 月(予定)

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

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究

研究分担者 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）
研究協力者 氏家誠、小瀧正次、影山努、白倉雅之、岸田典子、島袋梢、望月菊
（国立感染症研究所 ウイルス第3部 第1室）
堀川博司、藤田信之、細山哲、山田隆一、矢代勲
（製品評価技術基盤機構(NITE)バイオテクノロジー本部ゲノム解析部門）
（全国地方衛生研究所）

研究要旨 2007年11月頃から、オセルタミビルに対して耐性を示す A/H1N1 亜型インフルエンザウイルスが EU 諸国を中心に高頻度に分離され、その後世界中に広がりつつある。我が国は、全世界の生産量の 70%以上のオセルタミビルを使用していることから、市中流行の耐性株に加えて、薬剤の選択圧による耐性株の高頻度出現も危惧された。このため、本研究では国内における耐性株の発生状況を把握するために、A/H1N1 を中心とした NAI サーベイランスを行った。この結果、2007/08 シーズンの A/H1N1 耐性株の発生頻度は 2.6%（総解析数 1734 株中 45 株）と、諸外国に比べて極めて低い状況であった。一方、2008/09 シーズンの発生頻度は 99.4%（総解析数 830 株中 825 株）とわずか半年あまりで劇的に増加した。また、A/H3N2 亜型及び B 型は現時点で、耐性株の発生は確認されなかった。

A. 研究目的

2007年11月頃から、ノイラミニダーゼ（NA）蛋白質の 275 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシン(H275Y)に置換し、オセルタミビルに対して強い耐性となる A/H1N1 亜型インフルエンザウイルスが、ノルウエーの 67%を筆頭に EU 諸国全体で 20%以上の高頻度で検出されるようになった。このため、WHO グローバルインフルエンザサーベイランスネットワークでは、NA 阻害剤（NAI）耐性株サーベイランスを強化し、各国における耐性株出現状況を報告するように要請した。この報告によると、全世界の耐性株の発生頻度は、2007 年後半～2008 年 3 月に 16%、2008 年 4 月～9 月に 44%、そして 2008 年 10 月～2008 年 12 月には 92%と前シーズンを大きく上回り、世界的に耐性株が広がっている事がわかった。現時点において、米国では A/H1N1 分離株の 97%、EU 諸国では 98%、また豪州、中米、アフリカ

諸国では 80-100%がオセルタミビル耐性となっている。日本周辺では、韓国で 99%、台湾では 100%が耐性となっている

(http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html)。これまで、NAI 耐性株は発生しにくく、また、たとえ発生してもヒト-ヒト感染は起こりにくいと考えられてきた。しかしながら、今回の耐性株はオセルタミビルを服用していない患者から分離され、通常の伝播力をもったまま人々の間に広がっておりインフルエンザ対策上大きな問題となっている

(http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_faqs/en/index.html)。

わが国は世界のオセルタミビル生産量の 70%以上を臨床現場で使用していることから、市中流行の耐性株に加え、薬剤選択圧による耐性株の高頻度出現が危惧され国内外から日本の耐性株の発生動向が注目された。また、国内で耐性株が高頻度に発生すれば、インフルエンザ患者にオセルタミ

ビルを使用する薬剤治療方針に問題が生じる可能性も考えられる。このような背景から、国立感染症研究所（感染研）では地方衛生研究所（地衛研）の協力を得て、A/H1N1株を中心に国内で分離されたインフルエンザウイルスに対する耐性株サーベイランスを行った。

B. 研究方法

1. ウイルス：地衛研で分離されたインフルエンザウイルスのうち、07/08シーズンに検体採取されたA/H1N1 = 1734株、A/H3N2 = 89株、B = 78株、08/09シーズンに検体採取されたA/H1N1 = 830株、A/H3N2 = 44株、B = 25株について解析を行った。

2. NA遺伝子解析：A/H1N1に関しては感染研、地衛研又はNITEでNA遺伝子の部分的なシーケンス又は全長シーケンスを行い各機関にてH275Yマーカーの同定を行った。A/H3N2及びB型に関しては、感染研又はNITEにてNA遺伝子の全長解析を行い、既知の耐性マーカーについて検索を行った。

3. NAI薬剤感受性試験：オセルタミビルまたはザナミビル存在下でNA-star kit (Applied Biosystem社)を用いて分離株の薬剤感受性試験を行った。

C. 研究結果

1. 日本国内のA/H1N1耐性株発生状況

07/08及び08/09シーズンのA/H1N1耐性株の都道府県別発生状況を図1に示した。この結果、07/08シーズンは総解析数1734株中45株の耐性株が同定され、国内の耐性株の発生頻度は2.6%であった。わが国は世界一のオセルタミビル使用国にもかかわらず、当該シーズンは諸外国に比べるとその発生頻度は著しく低いことがわかった。耐性株が分離されたのは本州の10県であったが（図1：左）、鳥取県を除いた9県それぞれの発生頻度は、1.2～7.3%であった。一方、原因は不明だが、鳥取県では68株中22株が耐性株で、発生頻度は32.4%と突出していた。一方、08/09シーズンは状況が一変

し、総解析数830株中825株にH275Y耐性マーカーが同定され、耐性株の発生頻度は99.4%であった（図1：右）。地域的に41の都道府県で耐性ウイルスが検出されており、各地におけるA/H1N1分離株のほぼ100%がオセルタミビル耐性であった。A/H1N1耐性株はわずか半年あまりで劇的に増加しており、全国的に広く蔓延していることが示唆された。

2. NAI 薬剤感受性試験

07/08シーズンに分離された薬剤感受性株240株について、オセルタミビルに対する薬剤感受性試験を行った結果、薬剤感受性株のオセルタミビルに対する50%NA活性阻害濃度（IC50）の平均値は0.09nMであった。一方、07/08及び08/09シーズンに分離された国内耐性株のオセルタミビルに対するIC50値は、おおむね30.0nM以上を示し、薬剤感受性株に比べて300倍以上もオセルタミビルに対して感受性が低下していた。これらの耐性株の殆ど全てはザナミビルに対しては感受性であったが、07/08シーズンに鳥取県で分離された1株はオセルタミビル、ザナミビル両方に耐性であった。また、別の1株は、ザナミビルに耐性であった。

3. 抗原解析

07/08及び08/09シーズンに国内で分離された耐性株について、新旧ワクチン株およびその類似株に対するフェレット参照抗血清を用いた赤血球凝集抑制(HI)試験により、抗原性を解析した。この結果、解析した全ての耐性株の抗原性は、今シーズンのA/H1N1ワクチン株（A/ブリスベン/59/2007）と殆ど同じか4倍以内の抗原変異に収まり、抗原性はワクチン株に類似していることが示された（表1）。このことから、これらのオセルタミビル耐性A/H1N1ウイルスはワクチン株と類似しており、今シーズンのワクチンは有効であると考えられた。

4. NA 遺伝子系統樹解析

ここ数年のA/H1N1流行株は、NA遺伝子の系統樹上では、クレード2B（アミノ酸マーカー：H45N、G249K、T287I、K329E、G354D）およびクレード

2C (アミノ酸マーカール: S82P, M188I, I267M, L367I, V393I, T453I) に大きく分けられる(図2)。07/08 及び 08/09 シーズンに分離された日本を含む世界中の主な A/H1N1 耐性株は、今シーズンのワクチン株 (A/ブリスベン/59/2007) を代表株とするクレード 2B に属した(図2)。さらにクレード 2B は、D354G という特徴的なアミノ酸置換のマーカール配列を持つ群 (北欧系統) と持たない群 (ハワイ系統) に細分される。07/08 シーズンに分離された国内耐性株はハワイ系統及び北欧系統の2つの系統に属していたが、08/09 シーズンに分離された国内耐性株は全て北欧系統に属しており、07/08 シーズンに検出されたハワイ系統の耐性株は、08/09 シーズンでは見つかっていない。

2007年11月に横浜市で分離された一株 (A/横浜/91/2007株) のみは、サブクレード2Cに属していた。

5. A/H3N2亜型およびB型インフルエンザウイルスに対するNAI耐性株サーベイランス

07/08及び08/09シーズンに国内各地で分離された、A/H3N2=89株、B型=78株 (07/08シーズン) 及びA/H3N2=44株、B型=25株 (08/09シーズン) についても、オセルタミビル及びザナミビルに対する薬剤感受性試験を行った。この結果、08/09シーズンに分離されたA/H3N2の2株はザナミビルに対して30倍程度感受性の低下が確認されたが、その他の株は全て両薬剤に対して感受性であった。

D. 考察

07/08 シーズンに国内で分離されたオセルタミビル耐性 A/H1N1 株の発生頻度は、わずか2.6%だったが、08/09 シーズンに入り41都道府県から耐性株が分離され発生頻度は99.4% (830株中825株) となった。このことから、わずか半年あまりで国内においてもA/H1N1耐性株が劇的に増加している事がわかった。一方、A/H3N2 およびB型インフルエンザウイルスに対して明確な耐性を示す株は確認されていない。また、07/08 及び 08/09 シーズンに分離された A/H1N1 国内耐性株は今期のワク

チン株 A/ブリスベン/59/2007 に遺伝的にも抗原的にも類似しているため、ワクチンは有効であると考えられる。これに加えて、耐性株の殆ど全てはザナミビルに対しては感受性であることから、ザナミビルによる治療も有効である。

わが国は世界一のオセルタミビル使用国であるにもかかわらず、07/08 シーズンは諸外国に比べると発生頻度が著しく低かった事や、世界中の耐性株の大半はオセルタミビルが使用されていない地域で分離されている事から、今回の耐性株はオセルタミビルの使用によって耐性ウイルスが選択されて流行しているわけではない。病原性も通常のA/H1N1 流行株とは変わらず、特に重篤な症状を引き起こすとの報告はない。

現時点でのインフルエンザウイルスの分離・検出状況は、A/H1N1 が約60%、A/H3N2 が約30%、B型が約10%となっており、オセルタミビル耐性A/H1N1 株が全国的に分散していることから、全体のインフルエンザ分離ウイルスの半数以上が耐性株であると考えられる。臨床現場では、インフルエンザの診断に迅速診断キットが使用されるが、迅速診断キットはA型かB型かの鑑別は可能であるが、A/H1N1 か A/H3N2 か亜型の識別は不可能である。このため、A型インフルエンザとの型診断が出来ても、このA型ウイルスがオセルタミビルに感受性 (A/H3N2) なのか耐性 (A/H1N1) なのかを判別できないため、今後、臨床現場では抗インフルエンザウイルス薬を用いた治療戦略に大きな混乱が起こることが心配される。このような状況を踏まえて、米疾病対策センター(CDC)が、暫定的ながら、今冬における抗インフルエンザ薬の選択方針についての勧告を医師向けに出しており、地域でのインフルエンザウイルスの流行状況を十分に考慮してオセルタミビルかザナミビルかの選択をする事が強調されている

(<http://www2a.cdc.gov/HAN/ArchiveSys/ViewMsgV.asp?AlertNum=00279>)。

我が国では、900万人分のオセルタミビルと300万人分のザナミビルが08/09シーズンに向けて準備されている。従って、本インフルエンザNAIサーベイランスは、わが国のインフルエンザ対策にとって有用な情報を提供し、極めて重要な役割を担っている。よって、今後も、全国レベルで耐性