

図19 新型インフルエンザ対策の基本認識

- 最悪のシナリオを想定した世界規模の社会危機管理の問題である。(ウイルスによる全世界無差別テロ)
 - 単一で有効な防止・対応手段は無い。
 - 新型インフルエンザの出現、拡大、健康被害、社会・経済の被害を少しでも減らせる全ての手段・対応を駆使する必要がある。
 - 事前準備が不可欠である。
 - 中程度、軽度の流行には、柔軟性と余裕を持って対応する。
 - 緊急対応実施に伴う損害と補償
 - 基本的人権の制限、経済的損害
- 事前の法的整備、国民への説明と合意

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

研究要旨： 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・死亡例も報告されており、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は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。2009年は日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取された家禽、渡りガモおよびハクチョウの材料4,674検体から合計82株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらの分離株には高病原性のH5N1鳥インフルエンザウイルスや低病原性のH5N1ウイルスも含まれていた。これらのH5N1ウイルスはブタに感染するが、増殖性は豚インフルエンザウイルスや豚由来パンデミックインフルエンザウイルスのそれよりも低かった。また、HA開裂部位への塩基性アミノ酸の挿入とヒヨコを用いたウイルスの継代により、H9亜型のウイルスもH5やH7亜型の高病原性株と同等のニワトリ静脈内接種病原性を獲得することがわかった。

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。これまでに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がわかっている。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を第1の目的とする。さらにこれらのウイルスがヒトへの感染性を獲得する機構を解明し、新型インフルエンザ対策に資することを第2の目的とする。

B. 研究方法

日本、モンゴル、ベトナム、香港において家禽と野鳥から採取した気管ぬぐい液および糞便からインフルエンザAウイルスの分離を試みた。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。さらに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。

2009年に分離されたH5N1鳥インフルエンザウイルスA/whooper swan/Mongolia/6/2009 (H5N1)および豚インフルエンザウイルス、豚由来パンデミックインフルエンザウイルスをブタに接種し、哺乳動物に対する感受性、病原性を比較した。

鳥インフルエンザウイルスA/chicken/Yokohama/aq55/2001 (H9N2)のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の連続配列を人工的に挿入し、さらにヒヨコの気嚢で継代した。この継代したウイルスの塩基配列を決定すると共に、ニワトリに対する病原性を静脈内接種および経鼻接種により評価した。

C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便4,674検体から82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H1、H3、H4、H5、H6、H8、H9、H11、H12の9つの亜型に、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N5、N6、N8、N9の8つの亜型に区分された。分離されたウイルスにはH5N1亜型のウイルスも含まれており、モンゴルや香港の野鳥から分離されたウイルスは高病原性鳥インフルエンザウイルスであった。一方、

北海道で分離されたA/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)株はHA開裂部位に塩基性アミノ酸の連続は認められず、ニワトリに対し病原性を示さなかった。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加した。

2009年に分離されたA/whooper swan/Mongolia/6/2009 (H5N1)および豚インフルエンザウイルスA/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)、豚由来パンデミックインフルエンザウイルスA/California/04/2009 (H1N1)をブタに経鼻接種し、哺乳動物における感受性、病原性を比較したところ、H5N1ウイルスはブタに感染するが、増殖性は豚インフルエンザウイルスやパンデミックインフルエンザウイルスのそれよりも低かった。

鳥インフルエンザウイルスA/chicken/Yokohama/aq55/2001 (H9N2)のHA開裂部位にリバーシジェネティクス法を用いて塩基性アミノ酸の連続配列を人工的に挿入し、さらにヒヨコの気嚢内で継代した。この継代したウイルスの塩基配列を決定すると共に、ニワトリに対する病原性を静脈内接種および経鼻接種により評価した。その結果、継代に伴ってHAを中心にアミノ酸の変異が認められ、ヒヨコの気嚢で10代継代したウイルスは、4週齢のニワトリに対して致死的な静脈内接種病原性を示した。しかし、本ウイルスをニワトリに経鼻接種しても、致死的な病原性を示すことなく耐過した。

D. 考察

サーベイランスにより多様なインフルエンザウイルスが分離された。2009年に分離されたH5N1ウイルスもこれまでに調べたH5N1ウイルスと同様にブタの呼吸器で増殖するがウイルス排泄量は低く、哺乳動物に対する病原性は低いものと考えられる。

また、これまでH5とH7亜型のウイルスのみがニワトリに対して高い病原性を獲得すると考えられていたが、HA開裂部位への塩基性アミノ酸の挿入とヒヨコでの継代により、H9N2ウイルスもニワトリに対する静脈内接種病原性を獲得することが明らかになった。今後、本ウイルスの鳥類と哺乳動物に対する病原性を比較解析し、鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物への感染機構の

解明に役立てたい。

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によって、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が得られる。分離されたウイルスを用いた感染実験の成績から、鳥インフルエンザウイルスの鳥類と哺乳動物に対する感染機構の違い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) Itoh, Y., Ozaki, H., Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata, T., Soda, K., Isoda N., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K., Nakayama, M., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Subcutaneous inoculation of a whole virusparticle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. Vaccine, (in press).
- (2) Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., and Kawaoka, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses.

- Nature 460, 1021-1025.
- (3) Kashima, Y., Ikeda, M., Itoh, Y., Sakoda, Y., Nagata, T., Miyake, T., Soda, K., Ozaki, H., Nakayama, M., Shibuya, H., Okamatsu, M., Ishigaki, H., Ishida, H., Sawai, T., Kawaoka, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Intranasal administration of a live non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: Comparison of formulations and administration routes of vaccines. Vaccine. (in press).
- (4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H. (2009). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. J Virol 83, 1572-1578.
- (5) Miyake, T., Soda, K., Itoh, Y., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Nagata, T., Ishida, H., Nakayama, M., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Amelioration of pneumonia with Streptococcus pneumoniae infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. J Med Primatol, (in press).
- (6) Moritoh, K., Yamauchi, H., Asano, A., Yoshii, K., Kariwa, H., Takashima, I., Isoda, N., Sakoda, Y., Kida, H., Sasaki, N., and Agui, T. (2009). Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, Mx1 and Oas1b, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. Jpn J Vet Res 57, 89-99.
- (7) Sasaki, T., Isoda, N., Soda, K., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kokumai, N., Ohgitani, T., Imamura, T., Sawata, A., Lin, Z., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus. Jpn J Vet Res 56, 189-198.
- (8) Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Sakamoto, R., Takikawa, N., Lin, Z., Okamatsu, M., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. Vaccine 27, 5174-5177.
- (9) Simulundu, E., Mweene, A. S., Tomabechi, D., Hang'ombe, B. M., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Sainana, L., and Takada, A. (2009). Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. Arch Virol 154, 1517-1522.
- (10) Tsuda, Y., Isoda, N., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on MDCK cells. Virus Res 140, 194-198.
- (11) Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabechi, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009). Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. PLoS Pathog 5, e1000350.

2. 学会発表

- (1) H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第13回日本ワクチン学会学術集会 (2009年、札幌)
- (2) 「A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜」岡松正敏、山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、喜田

宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)

- (3) 「不活化鳥インフルエンザVac-1 (H5N1) ワクチンは2008年に野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染発症を予防した」山本直樹、佐々木崇、岡松正敏、迫田義博、林志鋒、坂元隆一、西條加須江、国米則秀、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
- (4) 「H9N2インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか？」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
- (5) 「H9インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
- (6) 「H7高病原性鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性の解析」栗林沙弥、田中智久、迫田義博、坂部沙織、磯田典和、津田祥美、岡松正敏、梅村孝司、喜田宏第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
- (7) 「近年流行を起こしているH3N8馬インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」本島昌幸、岡松正敏、浅倉真吾、伊藤美加、前田友起子、福田奈穂、R. Sodnomdarjaa、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

平成 21 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）

「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」

研究報告書

「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」

研究者 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

研究要旨：H5N1 インフルエンザウイルスが、ヒトに直接感染するもののヒト間での流行が起きていないのは、感染・増殖する部位が主に肺の深部であり、鼻や咽頭などの上部気道で効率よく増えていないためと考えられる。そこで、ヒトに感染した H5N1 ウイルスが、更にどのような変異を獲得した場合、上部気道でよく増え、効率よくヒト間で伝播するように変化するか調べるために、ヒト分離 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。更に、それらの継代ウイルスは、より上部の気道細胞（鼻腔上皮細胞）においてもよく増えるように変化していた。どの変異が高い増殖性に関与しているのか解析したところ、主にヘマグルチニン (HA) 蛋白質のレセプター結合部位における変異が重要であることがわかった。

A. 研究目的

2009 年 3 月に発生した豚由来の新型インフルエンザは、瞬く間に世界各地に拡がり、21 世紀初のパンデミックを引き起こした。今回の新型インフルエンザの拡大で、以前に比べると鳥インフルエンザがあまり注目されなくなっている。しかし、高病原性鳥インフルエンザウイルスが居なくなったわけではなく、H5N1 インフルエンザウイルスのヒトへの感染例は増加しており、警戒が必要である。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、ウイルスがどのよう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 年にベトナムでヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスを正常ヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞で継代し、増殖性の変化について解析した。さらに、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

ヒト分離 H5N1 ウイルスを NHBE 細胞で 8 回継代したところ、継代ウイルスは様々な変異を獲得し、NHBE 細胞にて高い増殖性を示すよ

うになった。さらに、それらの継代ウイルスは、より上部の気道細胞（鼻腔上皮細胞）においてもよく増えるように変化していた。どの変異が高い増殖性に関与しているのか解析したところ、主にヘマグルチニン (HA) タンパク質のレセプター結合部位における変異が重要であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究で、H5N1 ウイルスはヒト気管支上皮細胞で継代を繰り返すことで、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、この増殖性が向上したウイルスのレセプター特異性を明らかにするとともに、*in vivo* での伝播性を解析する必要がある。

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

Neumann G, Nota T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459:931-939, 2009.

Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Macken C, Kawaoka Y. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology*, 390:13-21, 2009.

Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:588-592, 2009.

Marsolais D, Hahm B, Walsh KB, Edelmann KH, McGavern D, Hatta Y, Kawaoka Y, Rosen H, Oldstone MB. A critical role for the sphingosine analog AAL-R in dampening the cytokine response during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1560-1565, 2009.

Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* 83:3384-3388, 2009.

Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. The MAPK-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol*. 83:2510-2517, 2009.

Fujii K, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y. Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *J. Gen.Virol.* 90:1734-1740, 2009.

Hata M, Kohlmeier CK, Hatta Y, Ozawa M, Kawaoka Y. Region required for protein expression from the stop-start pentanucleotide in the M gene of influenza B virus. *J. Virol.* 83:5939-5942, 2009.

Fan S, Deng G, Song J, Tian G, Suo Y, Jiang Y, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology* 384:28-32, 2009.

Kakugawa S, Shimojima M, Meumann G, Goto H, Kawaoka Y. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol*. 83:6429-6434, 2009.

Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimojima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 83:4153-4162, 2009.

Le QM, Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Ito M,

Kawaoka Y. Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *J Virol* 83:5278-5281, 2009.

Tamura D, Mitamura K, Yamazaki M, Fujino M, Nirasawa M, Kimura K, Kiso M, Shimizu H, Kawakami C, Hiroi S, Takahashi K, Hatta M, Minagawa H, Kimura Y, Kaneda S, Sugita S, Horimoto T, Sugaya N, Kawaoka Y. Oseltamivir-Resistant Influenza A Viruses Circulating in Japan. *J Clin Microbiol.* 47:1424-1427, 2009.

Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. Influenza A virus lacking M2 protein as a live attenuated vaccine. *J. Virol.* 83:5947-5950, 2009.

Fan S, Gao Y, Shinya K, Li CK, Li Y, Shi J, Jiang Y, Suo Y, Tong T, Zhong G, Song J, Zhang Y, Tian G, Guan Y, Xu XN, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog.* 5:e1000409, 2009.

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

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 21 年度研究分担報告書

沖縄県における 2009 年度の新型インフルエンザ疫学調査
(県全体における第一波の概要および同県宮古島市における流行インパクトの解析)

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 センター長
研究協力者: 島田智恵	国立感染症研究所 感染症情報センター 研究員
豊川貴生	国立感染症研究所 感染症情報センター 協力研究員 (FETP)
砂川富正	国立感染症研究所 感染症情報センター 主任研究官
谷口清州	国立感染症研究所 感染症情報センター 第一室長
古謝由紀子	沖縄県衛生環境研究所 企画管理班(企画情報グループ)主任研究員

研究要旨 本研究は 2009 年夏の沖縄県全域における新型インフルエンザ(H1N12009)流行下における実地疫学調査、および 2010 年 1 月現在進行中の沖縄県宮古島市におけるアンケート調査に基づく流行像把握調査、の二つからなる。沖縄県全域の調査からは、わが国における最初の第一波の概要が記述され、行政的な提言もなされた。同県宮古島市の調査からは、新型インフルエンザの疫学上のインパクトをより正確に測るための有用な傍証を得ることが期待される。

A. 研究目的

2009 年春よりわが国においても大きな問題となった新型インフルエンザについて、国内初の第一波が発生した沖縄県の流行像を把握すること、および 2 年前よりインフルエンザ発生全数把握調査(以下、全数調査)を実施してきた同県宮古島市において新型インフルエンザのインパクト(罹患率・入院率・重症化率など)の推定を目的として疫学調査を実施した。

B. 研究方法

2009年8月の調査については、沖縄県の関係者(県福祉保健部、同衛生環境研究所、同中央保健所・南部保健所・中部保健所)、那覇市立病院、県立南部医療センター・こども医療センター、県立中部病院を訪問し、サーベイランス情報、重症者・院内感染対策に関する情報を収集し、疫学的にまとめ、行政

や医療体制への提言を行った。調査においては、広範な地域をカバーするために、テレコミュニケーション機器の使用が検討された。その後の同県宮古島市における調査では、沖縄県宮古福祉保健所で実施されてきた全数調査によって把握された症例数をもとに、県立宮古病院より得られる入院者の情報などとともに、発症率、入院率、重症化率などを推定した。医療機関未受診のインフルエンザ様症例の数を把握するために、宮古島市全域に職場が分布している市職員(約1000人)を対象に、流行期間中の症状や前年のワクチン接種などについて自記式の質問票調査を行う。

(倫理面への配慮)

本調査で得られる情報は全て匿名化され、個人を特定しえない。

C. 研究結果

2009年8月25日現在の沖縄県における新型インフルエンザ実地疫学調査においては、新型インフルエンザの沖縄県内一例目が6月29日に認められて以降、定点あたりの県内インフルエンザ患者の報告数を見ると、第34週(8月17日～23日)の46.31をピークとして流行した。沖縄県における流行は日本本土に先行するものであった。狭い沖縄本島内であっても流行期のずれがあったことは特徴的であり、最初同島中部地区より流行が急速に立ち上がった。年齢群別患者報告数を見ると10歳代後半に最も多くの患者発生を認めたが(年齢中央値:16歳)、大部分の公立学校夏期休業が7月18日に始まって以降、定点報告における年齢群別割合としては20代以上が50%前後を占めたことは特徴的な状況であった。8月25日現在までに入院加療を要した例は27例報告され、うち57歳の宜野湾市の男性(血液透析中)が8月15日に死亡し、国内初の死亡例として報告された。沖縄本島中南部の主たる医療機関における情報収集では、感染の拡大に伴い経時的に受診患者が増加しているものの、特に週末の受診者数が、多く認められた。大半の患者において比較的軽症な新型インフルエンザの病状から、患者側により余裕がある時間帯における基幹救急医療期間への受診という行動につながっている可能性が示唆された。発熱患者以外の救急患者受け入れのためにも、行政による住民への広報やメディアに対する情報の共有、他の基幹病院以外の医療機関との連携が急務であると考えられた。地域によっては医師会や行政などによるそのような連携も有効に行われていた。

2010年1月初旬までの沖縄県宮古島市(2009年12月末の総人口55,190人)における流行の実態把握調査においては、2009年7月中旬までの流行開始以降、同10月22日の時点で、宮古島市においては、10歳代を最多に1,548人(人口の2.8%)のインフルエンザ様疾患患者が報告され、沖縄県内における流行ウイルス株の情報より大半が新型インフルエンザであると考えられた。そのうち入院した患者は5-9歳、0歳代の順に25人($25/1,548=1.6\%$)であった。脳症や重症肺炎などの重症者は無かった。宮古島

市における新型インフルエンザの流行インパクトに関する調査は本稿提出時点で現在進行中であり、同市における正確な罹患率・入院率・重症化率(・死亡率)などのデータが得られる予定である。

D. 考察

わが国で最初に第一波を経験した沖縄県における調査からは、特徴として、流行が地域単位で異なっており推移したこと、年齢分布として多くの学校が夏季休暇に入った7月中旬以降は20歳代が多く、その後の感受性者推移にも影響が考えられること、地域単位の救急診療体制や重症者の集約化などの連携が新型インフルエンザ流行下においては重要と考えられたこと、が挙げられる。

E. 結論

沖縄県の2009年新型インフルエンザ第一波の全体像が得られた。同県宮古島市における流行インパクトについては情報収集中である。

F. 研究発表

特記事項無し。

G. 知的所有権の取得状況

特記事項無し

医療および行政機関を対象とした
新型インフルエンザを含む感染症全般に係る電話相談窓口

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 センター長
研究協力者：山寺静子	国立感染症研究所 感染症情報センター協力研究員
小船富美夫	同上
中山幹男	同上
鈴木一義	同上
萩原敏且	同上
松本美弥子	同上

研究要旨 医療及び行政機関を対象とした新型インフルエンザを含む感染症に対する相談窓口を 2009 年 1 月より国立感染症研究所（戸山庁舎）の一室で開設している。開設してからこれまでに（2010 年 2 月末）、889 件の電話相談があった（メールによる相談は除く）。そのうち、新型インフルエンザに関する相談は 167 件（18.8%）であった（相談内容からみた新型インフルエンザの比率は 19%）。新型インフルエンザを含む全相談での相談者の職業をみると私企業がもっとも多く（25.5%）、次いで医療従事者（20.0%）、主婦（18.7%）、行政（10.3%）であった。電話相談で感じられることは感染症に対する幅広い知識が要求されることがわかった。また、新型インフルエンザに対する相談では、他のインフルエンザ相談窓口で満足できる回答が得られなかったという不満も一部寄せられた。

A. 研究目的

今年 4 月にアメリカとメキシコでブタ由来インフルエンザウイルスによる人への感染が発生し、瞬く間に全世界に波及した。WHO はこれを新型のインフルエンザとし、5 月 11 日にはパンデミックを示すフェーズ 6 を宣言した。我が国では 5 月中旬に一時的な流行があり、封じ込め対策がとられたが感染は持続し、9 月以降全国的な流行にはいった。厚生労働省は新型インフルエンザ対策として国民への情報伝達と正しい知識の普及が重要であるという観点から、季節性インフルエンザの相談窓口は保健同人社に、また、新型インフルエンザに対する相談窓口は同省内に設置した。我々の相談窓口は国立感染症研究所内におかれ、

感染研に電話がある医療機関及び行政機関からの季節性及び新型インフルエンザに対する質問および相談のうち、一般的な相談に応じることを目的とされたが、専門性の高い相談に対応することもあると思われた。また、インフルエンザ以外の感染症についても、対応あるいは担当部への連絡を行うことを目的とした。

B. 研究方法

電話相談窓口は 2009 年 1 月より国立感染症研究所（戸山庁舎）の一室に開設され、年末年始および祝祭日を除く月曜日から金曜日の午前 9 時半より午後 5 時まで、担当者 1 日 1 名（週 5 名）で対応した。また、国立感染症研究所（以下感染

研) 感染症情報センターからは電話相談のサポートとして1日2名の研究職員が担当するとともに、季節性インフルエンザ、新型インフルエンザ、ワクチンなどそれぞれ専門別の担当者が決められ、協力体制が整えられた。また、インターネットによる相談は、感染研総務部の調整係 (info@nih.go.jp) に送られたメールを電話相談の代表 (山寺静子) が感染研の専用アドレスをもって対応した。相談者には応答の際にアンケート調査の協力を得て可能な限り年齢、職種 (主婦を含む)、居住地の都道府県を聴取した。

相談の内容によっては関係部からの回答が適切とおもわれることがあるため、各部の業務 (取り扱っている感染症および病原体) および担当者が記載された一覧表により適切と思われる部へ転送した。

(倫理面への配慮)

問い合わせをした個人名が、外部に出ることはない

C. 研究結果

2009年1月から2010年2月までの13ヶ月に電話相談は総計889件であり、このうち新型インフルエンザの相談は167(18.8%)であった。月別に見ると新型インフルエンザのニュースが新聞をにぎわしたところが相談数のピークがあり、新型インフルエンザに対する相談が増加している。その後低下傾向にあったが日本での本格的な流行がはじまった九月頃に一旦増加したものの流行のピークに達した時期の電話相談はむしろ減少傾向にあった (図1)。

相談内容は新型インフルエンザが19%ともっとも多かった。次いで季節性インフルエンザ7.1%、麻疹、風疹などであった (図2)。その他の相談が66%と多いが、主な相談内容についてあげると、感染症としてデング熱、ノロウイルス下痢症、狂犬病、サイトメガロウイルス感染、HIV、肝炎、ムンプス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、パルボウイルス、SARS、ライム病、結核、Q熱、梅毒、STD、オウム病、つつが虫

病、アメーバ赤痢、レジオネラ、コリネバクテリウム、疥癬、ダニ、シラミ、マイコプラズマ、クラミジアなど多彩であった。また、ワクチンに関しては肺炎球菌、日本脳炎、ヒブ (Hib)、子宮ガン、ポリオについての相談があった。

相談窓口は医療機関、行政機関など比較的限られた範囲を対象に対するものであったが、職業について回答の得られた807名について職業別に見ると、もっとも多かったのは私企業からの相談で (25.5%)、次いで医療従事者 (20.0%)、主婦 (18.7%)、行政機関 (10.3%) の順であった (図4)。

D. 考察と結論

感染症についての相談窓口は過去数年にわたって経験しているが、これまでは市民相談窓口としてであった。今回医療機関および行政という限られた範囲であり、感染症研究所への電話ということから、相談件数はそれほど多くなかったが、質問は多彩であった。なお、新型インフルエンザに関する相談の詳細について図表に示していないので以下に相談内容を列記した。

1) 行政 (保健所など)、企業、学校、医療機関全体の共通した相談

検査法および検査可能な場所

フェイズ1-6について

ワクチン生産と接種順位および抗体について
マニュアル作成について

2) 企業

海外派遣社員の派遣先での新型インフルエンザの流行状況

タミフルの備蓄について社員および家族の予防法

新型インフル発生時の休暇、出勤について
消毒方法、予防法

感染者の自宅待機の日数

ワクチン接種について

3) 行政機関 保健所、自治体など

検査法、キットの入手法など

施設などでの対応

新型インフルエンザワクチンの備蓄について

予防衣について

ワクチン全般

4) 休校, 学級閉鎖について

修学旅行先 (韓国, ニュージーランド他)

の新型インフルの流行状況

部活動および学校行事のあり方について

マニュアル作成

消毒法, 予防法

国内の流行状況

5) 医療機関

ウイルスについて (旧ソ連型との相違など)

検査法について

ワクチンの免疫効果, 抗体獲得の時期

サーベイランス (定点, 患者数など)

季節性と新型ワクチンの同時接種は可能か

厚生労働省への意見など

などであった。

ここには一般市民からの相談内容については図2のその他の相談内容でも明らかなように、狂犬病、STDなど幅広く、多種の感染症に対する知識が要求されることがわかった。新型インフルエンザの流行を機に国民の感染症に対する関心がたかまり、ワクチンに対する理解も深まってきているが、新型インフルエンザに対する相談のなかで、他に設置されているインフルエンザ相談窓口で満足できる回答が得られなかったという不満が寄せられた。相談窓口を設置するに当たり、考慮しなければならない問題である。

F. 研究発表

特記事項無し。

G. 知的所有権の取得状況

特記事項無し

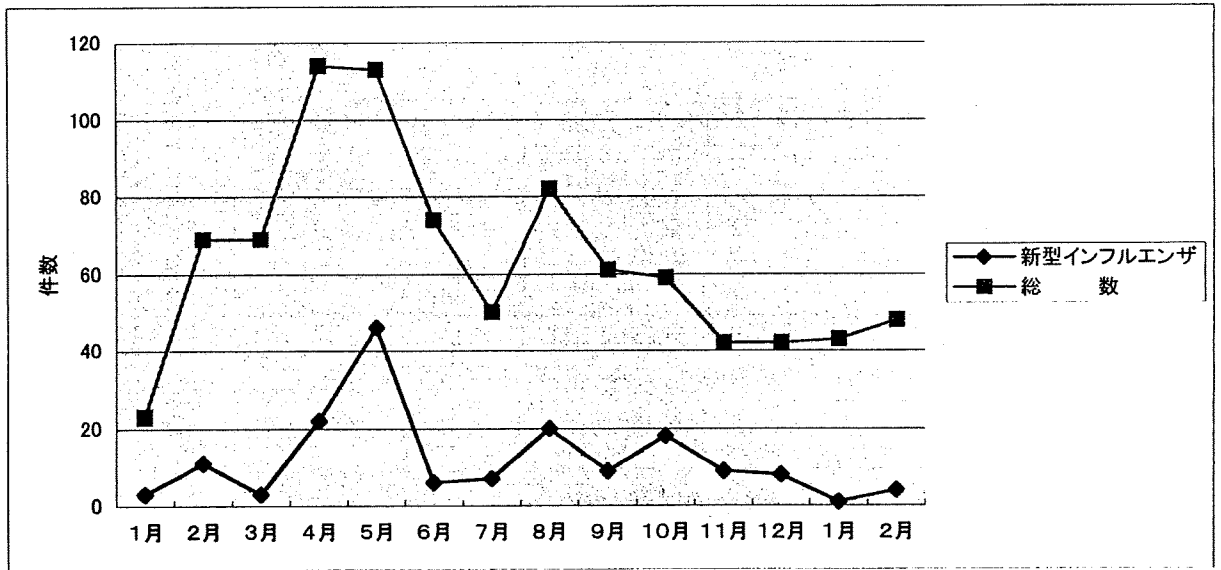


図1 月別相談件

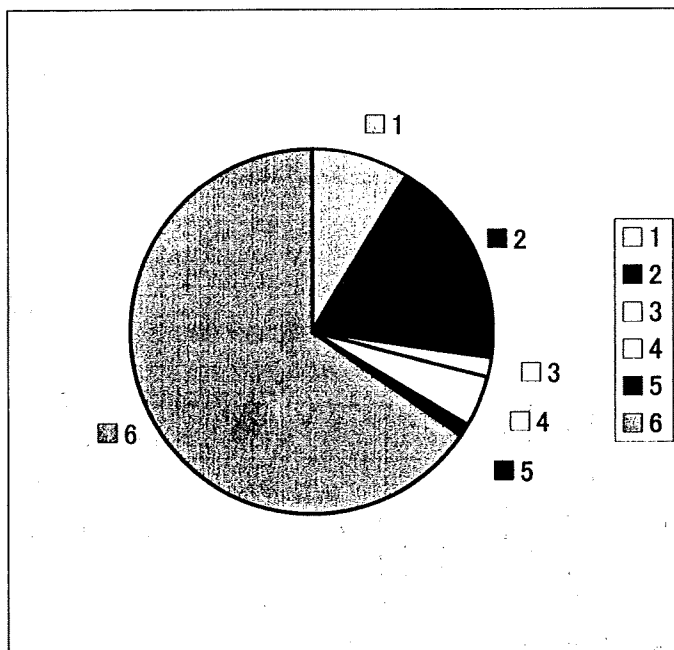
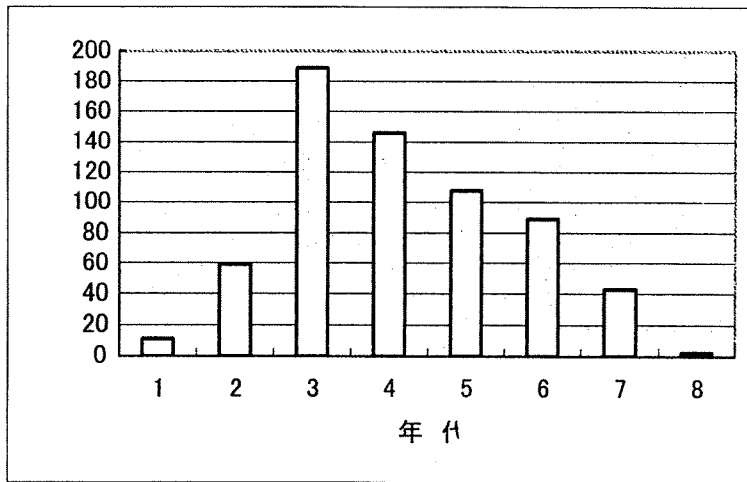


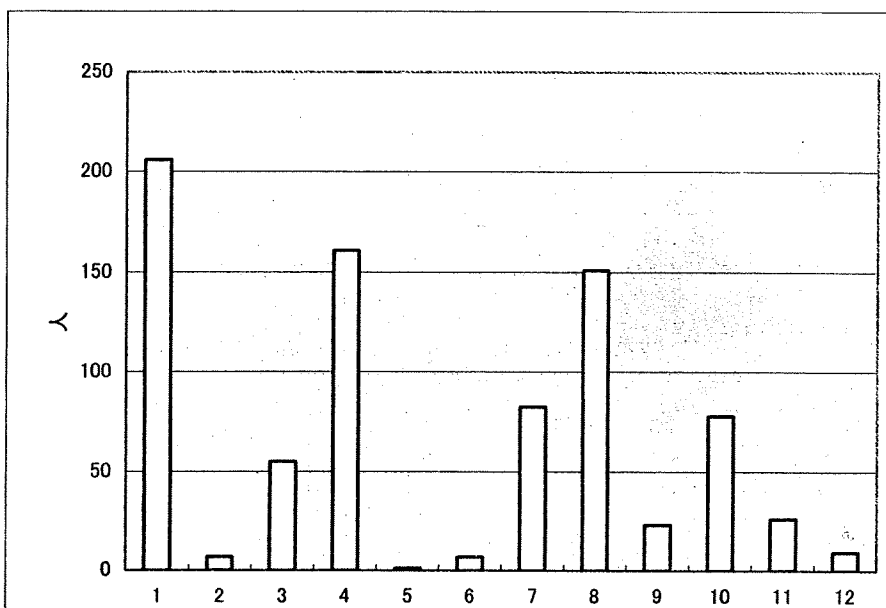
図2 相談内容 (複数の相談は複数件とした)



年代別判例

- 1: 10代
- 2: 20代
- 3: 30代
- 4: 40代
- 5: 50代
- 6: 60代
- 7: 70代
- 8: 80代

図3 相談者の年齢分布



- 1: 私企業
- 2: 食品関係
- 3: 学校
- 4: 医療従事者
- 5: 輸送関係
- 6: メディア
- 7: 行政機関
- 8: 主婦
- 9: 学生
- 10: 無職
- 11: 自営業
- 12: NPO法人

図4 相談者の職種

インフルエンザワクチン有効性評価法の開発

分担研究者 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)
阿戸 学 (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 (国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)
田代真人 (国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)

研究要旨 2009年新型インフルエンザウイルス（H1N1pdm）の大流行に伴い、スプリットワクチンの単回接種が実施された。その結果、H5N1プレパンデミックワクチンの場合と異なり、血清学的にナイーブな健常人においてH1N1pdmに対する中和抗体が効率的に誘導されることが確認され、何らかの交差免疫記憶の可能性が示唆されている。本研究では、ヒト免疫記憶応答を再構築したヒト化マウスを使用し、H1N1pdmに対する交差免疫応答を再現できるかどうか確認した。A/Narita/1/2009株に対する血清HI抗体価陰性のドナー9名から、末梢血リンパ球を調製しヒト化マウスを作製した。これらマウスに不活化A/Narita/1/2009株を接種したところ、ドナー9名のうち、6名由来のヒト化マウスにおいて抗体価の増加が認められ、A/Narita/1/2009株に対する交差免疫応答の存在が確認された。今後、このヒト化マウスを用いることにより、交差免疫記憶応答に必要なリンパ球サブセットやその抗原認識部位を明らかにすることが可能となる。

A. 研究目的

ヒト末梢血細胞を移入した免疫系ヒト化マウスを用い、新型インフルエンザウイルスに対する交差免疫記憶の誘導メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

(1) ヒト血清ならびに末梢血細胞の調製

新型インフルエンザウイルスに対する血清 HI 抗体価が 10 以下のボランティア（年令 21-55 才、男 / 女 = 2 / 1）からヘパリン含有末梢血を採取し、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/Narita/1/2009 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 IgG 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（ 5×10^7 個）を NOD/SCID/Jak3^{-/-} マウス尾静脈に移入後、不活化 A/Narita/1/2009 を

接種した。10日後に、尾静脈より採血し、血清中に含まれるヒト抗ヘマグルチニン IgG 抗体価を測定した。

(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 抗体価と HI 抗体価の測定

17名のボランティアから血清を採取し、Narita 株の HA に結合する IgG 抗体価を ELISA 法で測定した (図 1)。また、鶏赤血球を用いて、不活化 Narita 株に対する HI 抗体価を測定した。その結果、ドナー間でばらつきはあるものの、Narita 株の HA に結合する IgG 抗体価が存在することが明らかとなった。しかしながら、いずれの血清も検出限界以下 (<10) の HI 抗体価しか示さなかった。

(2) H1N1pdm 不活化粒子に対する交差記憶応答の測定

9名の HI 抗体陰性のドナーから末梢血リンパ球を調製し NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに移植した。不活化 Narita 株をこのマウスに接種後、血清中に産生されるヒト抗 Narita HA IgG 抗体価を測定した (図 2)。すると、9名中6名のドナーを移植したマウスにおいて抗 HA IgG 抗体価が検出され、これらの末梢血細胞中に交差免疫記憶応答を示すリンパ球が含まれていることが明らかとなった。

D. 考察

2009年に発生した H1N1pdm に対し、60歳以下のほとんどの人は血清学的にナイーブである。この

ようなナイーブな免疫系を賦活して中和抗体を誘導するためには、アジュバントの添加や複数回接種等が必要となることが H5N1 プレパンデミック ワクチンの例で報告されている。しかし H1N1pdm ワクチンの場合、スプリットワクチンの単回接種でも、HI 抗体価や中和抗体価の有意な増加が認められることが判明した。最近の複数のグループの研究から、季節性インフルエンザウイルスにより誘導された CD4 陽性記憶 T 細胞が、新型インフルエンザウイルスに交差反応することが明らかにされ、交差性記憶 T 細胞の存在が、スプリットワクチン接種後の速やかな中和抗体産生に繋がるモデルが提示されている。しかしながら、季節性インフルエンザウイルスで誘導された記憶 T 細胞は、H5N1 ウイルスにも交差反応する例が報告されているため、H5N1 プレパンデミック ワクチンと H1N1pdm ワクチンの抗体惹起能の差をこれだけで説明することは困難である。そのため、新型インフルエンザウイルスの場合には、交差性記憶 T 細胞の存在以外の要因が必要と考えられるが、現時点でその詳細は不明である。本研究において、新型インフルエンザウイルスに対する交差免疫記憶応答をヒト化マウスにおいて再構築することに成功した。今後、移入する末梢血細胞を操作し、産生される抗体価、中和活性を調べることにより、H1N1pdm ワクチンに特有な交差免疫記憶の原因メカニズムを明らかにする予定である。

E. 結論

ヒト末梢血細胞を移入した免疫系ヒト化マウスを作製した。このマウスにおいて、新型インフルエンザウイルスに対するヒト交差免疫記憶を再現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.* 199, 1629-1637, 2009

2. 学会発表

[国内学会発表]

(第13回日本ワクチン学会、札幌、2009年9月)

- (1) 高橋宜聖、小野寺大志、阿戸学、小田切孝人、田代真人、小林和夫「ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザウイルス感染防御能の解析」

(第39回日本免疫学会、大阪、2009年12月)

- (2) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖「T cell-independent activation of memory B cells with B-2 phenotype by whole virus particles」
- (3) 加地友弘、杉本晶子、疋田正樹、饗場祐一、高橋宜聖、黒崎知博、竹森利忠「Non-mutated memory B cells develop under T-cell help without germinal center reaction, followed by the functional maturation as immune response progresses」

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 HA IgG 抗体価の比較

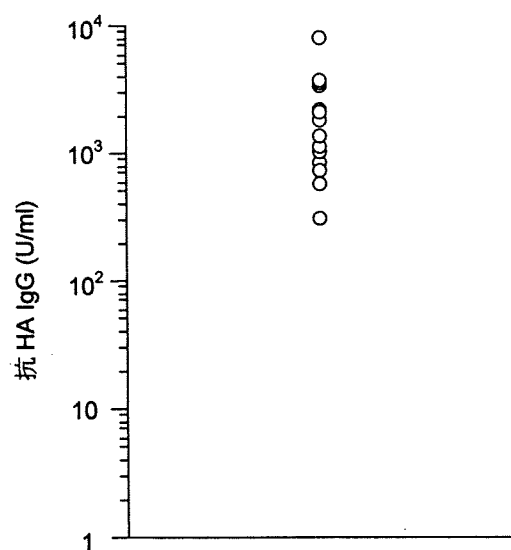
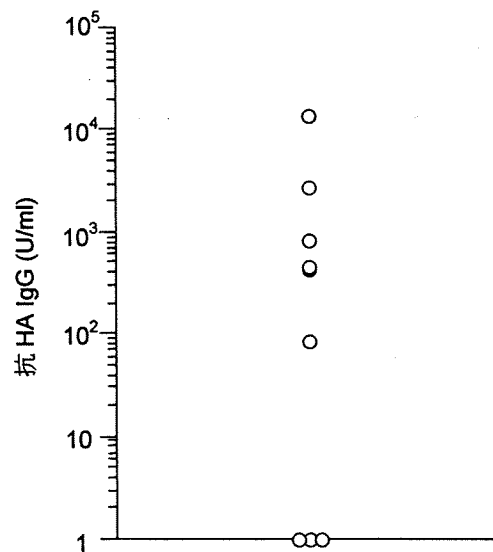


図2 マウスに移植したヒトリンパ球の交差液性記憶応答の測定



「新型インフルエンザウイルスの感染予防法の開発」

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：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 流行株の予測が不可能な新型インフルエンザの予防の為には交叉防御能のある粘膜免疫を誘導するワクチンの開発が必須である。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粘膜免疫誘導の為の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。アジュバント作用が確認されたキノコ菌糸体抽出物について高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンでワクチン株だけでなく clade の異なるウイルス感染に対し防御効果が示された。またそのアジュバント作用の分子メカニズムにアダプター分子 MyD88 が関与している事がしめされた。

A. 研究目的

本年度初頭メキシコを発端とした豚インフルエンザ由来の新型インフルエンザ H1N1 が出現し瞬く間に世界流行を見せた。また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。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。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シ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 gracilentata*, *Naematoloma sublateritium*, *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。

抗原特異的 T 細胞応答

ブースター免疫の 1 週間後に脾臓細胞を採取し単一細胞で浮遊培養する。脾臓細胞から磁気細胞ソーター(MACS: Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany)を用いて CD11b⁺ (Mac-1), CD45R⁺ (B220), DX5⁺ and Ter-119⁺ 細胞を除去し T 細胞を準備した。抗原提示細胞は脾臓細胞から CD90 (Thy1.2)⁺ 細胞を除去した後 2000 cGy の放射線を照射して準備した。

脾臓細胞より得た T 細胞(1×10^5 cells/well)を放射線照射した抗原提示細胞(5×10^5 cells/well) を A/PR8 と共に培養し 4 日後の培養上清中のサイトカインを ELISA 法で interferon- γ を測定した。

骨髄由来樹状細胞

野生株マウスおよび MyD88 欠損マウスの大腿骨から骨髄由来樹状細胞を準備した。G-CSF と共に培養し 5 日目に Lipopolysaccharide (1 μ g/ml), Zymosan (2 μ g/ml), *Phellinus linteus* (5 μ g/ml), *Macrolepiota gracilentata* (5 μ g/ml), *Lentinula edodes*