

201028005A

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

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 23 年(2011)3 月

目 次

平成 22 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. 17

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. 21

研究分担者：河岡義裕

3. 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..... P. 23

研究分担者：岡部信彦

研究協力者：山寺静子、松本美弥子、萩原敏且、小船富美夫、中山幹男

4. インフルエンザワクチン有効性評価法の開発..... P. 27

研究分担者：高橋宜聖

研究協力者：小野寺大志、阿戸学、小林和夫、小田切孝人、田代真人

5. 経鼻インフルエンザワクチンの有効性に関する研究..... P. 31

研究分担者：長谷川秀樹

研究協力者：相内章、鈴木忠樹、田村慎一、伊藤良、エリー・ヴァン・リート、
奥野良信、宮崎隆、田中伸哉、澤洋文、坂井直樹、安武義晃、新井洋由、
千葉丈、小淵正次

6. 馬 II 型インフルエンザウイルスの NAI 感受性について..... P. 37

分担研究者：西藤岳彦

協力研究者：内田裕子、真瀬昌司、齋藤玲子、鈴木宏

7. インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性の評価によるワクチン効果に
関する研究..... P. 40

研究分担者：小田切孝人

協力研究者：岸田典子、徐紅、伊東玲子、土井輝子、菅原裕美、高下恵美、江島美穂、
藤崎誠一郎、金南希、齋藤玲子

8. RT-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay を利用したオセルタミビル耐性新型
インフルエンザスクリーニング方法の確立および医療従事者コホートにおける新型インフルエ
ンザ感染に関する研究..... P. 45

研究分担者：押谷仁

協力研究者：貫和奈緒、小田切崇、古瀬祐気、鈴木陽

9. 鳥型からヒト型への変化に関する分子基盤および抗インフルエンザ創薬..... P. 50

研究分担者：鈴木康夫

III 研究成果の刊行に関する一覧表..... P. 53

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

総括報告書

研究代表者 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長

研究要旨 2003年後半以来世界で拡大中のH5N1高病原性鳥インフルエンザは、既に鳥の間で定着して、2009年発生の(H1N1)2009パンデミックの間にも、これとは独立に鳥の間での流行を続けている。人の患者も530人、死亡320以上が確認され、致死率は60%を超える。鳥における流行は依然制圧される可能性は無く、さらに中国やインドネシアではブタにおける不顕性感染も報告されており、何時でも新型インフルエンザが出現して大流行することが危惧されている。本研究は、地球レベルの視点に基づき、新型インフルエンザ大流行の際の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、①新型インフルエンザの出現予知と早期検知方法および流行動向監視方法の開発、②ウイルスの迅速性状解析に基づく大流行の可能性・被害予測のリスク評価法の確立、③緊急ワクチン開発・製造・供給及び効果・副作用の予測とモニター、④抗ウイルス剤の備蓄と使用方法及び効果・副作用・耐性ウイルスの予測とモニター、⑤感染病理機構の解明と治療方法の開発、などの時系列的な緊急対策・行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的基盤と実用化応用の確立、を検討とした。

世界各地におけるトリでの流行状況、ヒト型への変化に必要な遺伝子変異、ヒト型に変化した場合の病原性の程度、これらに対する分子疫学情報とそのモニター方法を確立し、それらの情報によるリスク評価を行った。その結果、H5N1新型インフルエンザの出現の危険性は変わっていないこと、むしろその可能性が高まっていることが指摘できる。新型インフルエンザ(H1N1)2009の流行中にもH5N1の流行およびヒトへの感染は独立して各地で拡大しており、特に日本を含む東・東南アジアでは北方からの渡り鳥が同じサブクレードのH5N1ウイルスを広い地域に拡散させていることから、北方の営巣湖沼がH5N1で汚染されてしまった可能性がある。さらに、中国とインドネシアにおいてH5N1ウイルスがブタで不顕性感染をしていることが明らかとなり、新型H1N1pdmウイルスとトリH5N1との同時感染による遺伝子交雑によって、突然に強毒型インフルエンザが出現する危険性も指摘された。また、その際には、全身感染とサイトカインストームによる多臓器不全という、インフルエンザの概念を超える重症疾患の可能性が高いことが示された。その結果、過去に例を見ない多数の患者、死亡者が出て、医療サービスの崩壊などの健康危機が危惧される。さらに、2次的な交通・物流機構の麻痺による食糧やエネルギー供給、社会サービスなどが低下し、社会・経済機能や治安体制の破綻、更には地球レベルの危機が懸念されるので、これらの最悪の事態に備えた事前準備と緊急対応体制の整備が必要である。

一方、トリの間で流行中のH9N2やH6などの弱毒型インフルエンザウイルスによる新型インフルエンザの可能性もあるが、健康被害、社会機能への影響などは、H5N1に比較すると軽度であると予想される。従って、弱毒性のパンデミックの際の緊急対応については、健康被害を最小限にとどめることを目的として、病原性や予測される被害程度に応じて、必要十分な対応を行えるように、柔軟性をもった対応計画の整備が必要である。

平成 21 年 4 月に、ブタインフルエンザ由来の新型インフルエンザ(H1N1)2009 が発生した。発生初期において、ウイルス遺伝子の全塩基配列および抗原解析結果の検討をもとに、これまで蓄積されてきた病原性規定遺伝子などの知見に基づいてリスク評価を行い、その結果に基づいて、様々な健康被害予測やワクチン開発・接種に対する提言をおこなった。さらにそれらに関して、実際に検証作業を実施したところ、当初のリスク評価に基づく予想の多くは、実際のウイルスの性状と流行実態、およびワクチンや抗ウイルス薬の効果と、非常によく一致していたと評価される。

一方で、殆ど予想されていなかったこのウイルスの出現については、十分な事前のリスク評価はなされていなかった。その大きな理由は、国際的にも鳥とブタにおけるインフルエンザ監視体制が構築されておらず、また鳥における H5, H7 以外は報告の対象となっていないことにある。人における新型インフルエンザの出現、病原性、健康被害、社会・経済的影響などに対するリスク評価と予測には、トリとブタなどの動物におけるインフルエンザの流行動向、ウイルスの性状解析などに関する情報が必須であるが、現在の体制ではこれらの情報が得られないことが大きな問題である。さらに、これらの情報とリスク評価に基づき、事前に、警戒警報の発令、診断法の開発、ワクチン株の開発・製造・事前接種、抗ウイルス剤の効果・耐性予測などの、緊急時前対応が可能であった可能性がある。そこで、今回の教訓をもとに、事前のリスク評価に必要な情報の収集、その解析法および評価方法の再検討を行い、実際の流行、ウイルスの動向について、その適格性を評価した。

一方、インフルエンザは人獣共通感染症の代表であり、動物の健康はそのままヒトの健康に直結する。まさに「One flu, One health」なのであり、その病原体であるインフルエンザウイルスは動物とヒトに共通のウイルスである。これを境の無い一つの問題として捉え、お互いの壁と超えた協力関係の構築が、インフルエンザ問題の解決には必須な作業である。

現在、FAO, OIE, WHO が協力して、「One flu, One health」の合言葉のもとに、animal sectors と public health sectors を横断的に統合するような総合的インフルエンザ対策の実施体制の構築を検討している。我が国においても、このような取り組みが必要であり、官庁部局の壁を越えた協力体制の確立を目指す必要がある。

研究分担者

喜田 宏 北海道大学大学院人獣共通感染症研究センター

河岡義裕 東京大学医科学研究所大学院

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

インフルエンザウイルス研究センター

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

西藤岳彦 独立行政法人動物衛生研究所

押谷 仁 東北大学大学院医学研究科

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、世界各地に拡大した H5N1 型高病原性トリインフルエンザの流行では、520 名を超える感染患者が出ており、流行収束の見通しは無い。今年度になって、日本を含む東・東南アジアでは北方からの渡り鳥が同じサブクレードの H5N1 ウイルスを広い地域に拡散させていることから、北方の営巣湖沼が H5N1 で汚染されてしまった可能性がある。さらに、中国とインドネシアにおいて H5N1 ウイルスがブタで不顕性感染をしていることが明らかとなり、新型 H1N1pdm ウイルスとトリ H5N1 との同時感染による遺伝子交雑によって、突然に強毒型インフルエンザが出現する危険性も指摘された。

昨年度の研究によって、鳥ウイルスは様々な遺伝子変異を遂げて得おり、このまま経過すれば、人での新型インフルエンザ大流行の可能性は高いと判断され、その際には、全身感染とサイトカインストームによる多臓器不全という、インフルエンザの概念を超える重症疾患の可能性が高い。その結果、過去に例を見ない多数の患者、死亡者が出て、医療サービスの破綻などの健康危機や、交通・物流機構の麻痺による食糧やエネルギー供給、社会サービスなどの破綻による社会・経済機能や治安体制の崩壊などの危機が懸念されている。

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、行政の大きな責任である。我が国でも、国内外の緊急事態に即応する新型インフルエンザ危機管理体制の早急な確立を進めている。しかし、新型インフルエンザ出現時期が予想不可能で、また予想される患者の病態、健康被害および社会的影響が不確定であるために、新型インフルエンザの危機に対する現実性が希薄で、関係者間での危機感の共有と政策実施の継続が困難となってきている。そこで、新型インフルエンザ出現の可能性、時期、被害等について、具体的な数値を挙げた説得力のある政策根拠の提出が求められ、それに応じた現実的な準備・対応が期待されている。

本研究の目的は、このような事態に対応して、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・行動計画の具体的な内容の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤と実用化応用を確立することにある。さらにこれまでの研究実績に基づいて、東南アジア諸国が鳥に対するワクチン接種の導入を進めたために不顕性感染となっているが、その実態と危険性評価、H5N1患者の報告数が減少している背景、H5N1以外の亜型の可能性などについても研究対象を拡大して行った。今年度の新たな目的としては、トリ、ブタにおける流行およびウイルス性状の把握に基づいて、新型インフルエンザ出現のリスク評価を行う際に必要な遺伝子情報、生物学的性状などの項目の再検討を行うとともに、新型候補ウイル

スについて、ヒト型への変化が起こる以前に動物の間における流行に留め、パンデミックを回避する戦略・戦術を検討した。

一方、トリの間で流行中の弱毒型インフルエンザウイルスによる新型インフルエンザの可能性もあるが、健康被害、社会機能への影響などは、H5N1に比較すると軽度であると予想される。従って、この際の緊急対応については、健康被害を最小限にとどめることを目的として、病原性や予測される被害程度に応じて、必要十分な対応を行えるように、柔軟性をもった対応計画の整備が必要である。このようなトリ弱毒型ウイルスに由来する新型インフルエンザの出現リスク、その場合の健康被害、社会的影響などについて、評価を行った。

平成21年4月に、ブタインフルエンザ由来の新型インフルエンザ(H1N1)2009が発生した。殆ど予想されていなかったこのウイルスの出現については、十分な事前のリスク評価はなされていなかった。しかし、4月下旬にA/California/7/2010(H1N1)pdmについて行われたウイルス遺伝子の全塩基配列および抗原解析結果の検討をもとに、これまで蓄積されてきた病原性規定遺伝子などの知見に基づいて、ウイルスの病原性、抗ウイルス剤の効果予測、ワクチンの効果予測、健康被害の程度、流行拡大の程度、社会的な影響等についてのリスク評価を行った。昨年度に引き続き、これらの予測について、実際に流行したウイルス株、流行状況、健康被害等について、ウイルス学的に実証作業を進め、予測とリスク評価の妥当性を検討した。また、これらの知見を、新型インフルエンザ行動計画案の検討に提供した。

B. 研究方法

① 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。また近年分離されたウイ

ルスの塩基配列と共に分子系統樹解析を行った。2010年5月にモンゴルにおいて野生オオハクチョウから分離されたA/whooper swan/Mongolia/1/2010 (H5N1)および同年10月に北海道稚内でカモの糞から分離されたA/duck/Hokkaido/WZ83/2010 (H5N1)をニワトリとカモに接種し、病原性を比較した。

②PB2蛋白質の627番目や701番目のアミノ酸が、ともに鳥型でありながら、ヒト気管支上皮細胞でよく増えるヒト分離 H5N1 ウイルスと、あまり増えない鳥分離 H5N1 ウイルスを用いて、様々な遺伝子型の組み合わせを有するリアソータントをリバースジェネティクス法で作製し、その増殖性を比較することでヒト細胞での増殖性に重要なアミノ酸の同定を試みた。同定したアミノ酸を鳥分離株に導入し、マウスにおける病原性を評価した。パンデミック(H1N1)2009 ウイルスにおいても、同定したアミノ酸の位置の重要性をフェレットにおける伝播実験にて解析を行った。さらに、X結晶構造解析を行い、同定したアミノ酸変異による構造的な変化を調べた。

③鳥インフルエンザウイルスの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。

④2004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。

⑤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30分より午後5時まで、担当者1日1名(週5名)で対応した。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研究職員が担当するとともに、それぞれ専門別の担当者が決められ、協力体制が取られた。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、性別、職種、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思われることから、各部の業務および担当者が記載された一覧表により当該部へ転送した。

個人情報保護のためアンケート調査では個人名を聴取しなかった。

⑥ワクチンに対する免疫反応の研究

(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) フローサイトメトリによるT細胞と記憶B細胞の分離

ヒト末梢血単核球を抗CD19 Pacific Blue抗体、抗CD3 FITC抗体、抗CD27 APC抗体、Propidium iodideで染色し、CD19⁺CD27⁺記憶B細胞とCD3⁺T細胞を分離した。

(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

記憶B細胞とT細胞を移入したNOD/SCID/Jak3^{ca}マウスに不活化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抗体価を測定した。

(4) 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Ig抗体で検出した。

(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。

⑦ワクチン接種

成人ボランティア5名に2009/10シーズン季節性インフルエンザワクチンに含まれるA/Uruguay/716/07 (H3N2) の三倍濃縮スプリットワクチン (45 µg HA/500 µl 接種) を3週間間隔で計5回経鼻接種した。なお本実験スケジュールは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。

採材とサンプル調製

ワクチン接種開始より3週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った。鼻腔洗浄液は、市販の鼻うがい用器具を用い、生理食塩水にて洗浄することにより回収した。回収した鼻腔洗浄液をコットンロールに吸収および溶出することで、粘性の高い鼻汁および粗雑物の除去を行い、次いでVivaspin遠心濃縮チューブを用いて鼻腔洗浄液の濃縮を行った。

総タンパク量、抗体量の定量

鼻腔洗浄液中の総タンパク量はBCA定量法により測定を行った。また、血清および鼻腔洗浄液中に含まれるアルブミン、IgM、IgGあるいはIgA抗体量はELISA法により測定を行った。

中和抗体価とHI抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。段階的に希釈した血清あるいは鼻腔洗浄液と100 TCID₅₀ (100倍量の50%組織培養感染量) のウイルスとの混合液をMDCK細胞に添加し、3〜4日間培養を行った。顕微鏡を用いて観察を行い、各サンプルにおいてインフルエンザウイルスによる細胞変性効果のみられない最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

HI抗体価の測定は、通常の赤血球凝集反応阻止試験により求めた。RDE処理を行った血清あるいは鼻腔洗浄液を段階希釈し、4HA価の七面鳥血球の添加45分後に、赤血球の凝集反応阻害がみられたサンプルの最大希釈倍率の逆数をHI抗

体価とした。

⑧ (1) 2007年から2008年にかけて、国内で発生した馬インフルエンザ起因ウイルス(H3N8 亜型)13株について、NA遺伝子の塩基配列を決定した。馬II型インフルエンザウイルスのプロトタイプであるA/Equine/Miami/63(Eq/Miami/63)のNA遺伝子との間で、塩基配列、推定アミノ酸の相同性を計算した。

(2) ノイラミニダーゼ阻害試験(IC₅₀)にタミフル活性体(GS4071)およびZanamivirに対するノイラミニダーゼ活性50%阻害濃度を、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、A/Texas/131/02(H3N2)およびR292K変異株を用いた。

⑨4月24日、米国カリフォルニア州の患者検体より分離された新型A/H1N1pdmウイルス(カリフォルニア株)の遺伝子配列が公開された。この配列を元にして、新型A/H1N1pdmウイルスのみを特異的に検出する検査系の構築に取り組んだ。H1亜型のブタインフルエンザウイルスには、北米およびユーラシアの2系統の古典的ブタインフルエンザウイルスが知られている。また、鳥で循環しているH1亜型インフルエンザウイルスやヒトで流行している季節性のA/ソ連型(H1N1)ウイルスも存在し、H1亜型は、ブタ北米系統、ブタユーラシア系統、鳥北米系統、ヒト季節性と大きく四つに分ける事ができる(図1)。新型A/H1N1pdmウイルス(カリフォルニア株)は、HA遺伝子の系統樹解析の結果ブタ北米系統に分類された。そこで季節性のA/ソ連型(H1N1)ウイルス、A/香港型(H3N2)には交差せず、北米系統のブタインフルエンザウイルスのHA遺伝子のみをコンベンショナルRT-PCR法もしくはTaqManプローブを用いたリアルタイムRT-PCR法により検出できるように、いくつかのプライマーおよびプローブの設

計を行った。

⑩ 2009年の7月から12月に、仙台市内の医療施設をインフルエンザ様症状にて受診した患者が咽頭拭い液を採取し、それらを MDCK 細胞に接種しウイルス分離を行った。分離株より RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にて RNA の抽出を行い、インフルエンザに特異的な primer Uni12 (Hoffmann et al., 2001) を用いて complementary DNA を作成した。また、耐性ウイルスのコントロールとして岩手県環境保健研究センターから分与して頂いた A/Iwate/3/2009(H1N1) を使用した。275 番目の histidine(CAC) もしくは tyrosine(TAC) をコードする塩基を挟んで増幅するプライマーを設計した。その際、既存の制限酵素ではいずれの配列も認識し消化できないため、forward primer の 3' から 3 番目を T から A になる変異を入れ制限酵素 *BcII* が histidine をコードするアミノ酸 CAC のみを認識し消化できるようにした。これにより、275 番目が histidine (感受性) である場合のみ制限酵素 *BcII* により PCR 産物が 198 bp と 26 bp に開裂し、tyrosine (耐性) の場合 224 bp のままとなる。分離株を設計したプライマーと *TaKaRa Ex Taq* (TAKARA, Shiga, Japan) を用いて増幅後、PCR 産物 5 μ L を制限酵素 *BcII* (NEW ENGLAND Biolabs) にて処理し、4% のゲル (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた電気泳動を行った。また Big Dye Terminator (version 1.1; Applied Biosystem, Foster City, CA), および 3130 genetic analyzer (Applied Biosystem) を用いて同領域の塩基配列を確認した。

⑪ 2009 年の第 38 疫学週から翌年 2010 年の第 14 疫学週 (2009 年 9 月から 2010 年 3 月) までを研究対象期間とした。対象となったのは、宮城県仙台市内 18 ヶ所の外来小児科医療施設に勤務する医師 25 名と看護師をはじめとするその他 113 名の計 138 名とした(表 2-1)。これらの対象者から、

定期的に咽頭拭い液および血清を採取し、インフルエンザウイルスへの感染を確認すると同時に、症状の有無を連日記録してもらった。

ウイルス分離

咽頭ぬぐい液を原則医師からは 1 週間に 1 回、その他の医療従事者からは 2 週間に 1 回の定期採取を行った。それらを MDCK 細胞に接種し、インフルエンザウイルスの分離を試み、同定は赤血球凝集阻止試験もしくは A 型インフルエンザウイルスを鑑別できる PCR により行った。

抗体価測定

血清を原則医師からは 2 週間に 1 回、その他の医療従事者からは 4 週間に 1 回の定期採取を行った。血清を RDE II で処理し、A/California/07/2009 に対する抗体を赤血球凝集阻止試験および中和試験にて行った。これらの試験に使用したウイルスおよびウイルス抗原は国立感染症研究所から分与して頂いた。

健康調査アンケート

研究期間中、対象者の健康状態を把握するために対象者全員に体温、症状の有無等の健康状態に関するアンケートに連日記入してもらった。そのアンケートを基に急性呼吸器疾患 (ARI)、インフルエンザ様疾患 (ILI)、その他の軽症、症状なしの 4 つのグループに分けて抗体価測定と合わせて解析を行った。

⑫ イムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖結合特異性監視法を様々な条件で構築した。N 型-シアロ糖鎖の精密構造は、高速液体クロマトー質量分析により調べた。様々な天然、化学合成化合物につき、インフルエンザウイルス感染阻害、ヘマグルチニン、シアリダーゼ活性阻害評価を行った。

C. 結果

各分担研究の結果概要については、以下のとおりである。1. パンデミックの予知とリスク評価に関する研究

1) 喜田 宏

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便5,642検体から合計85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からH11の11の亜型に、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N6、N7、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、香港、日本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。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。A/whooper swan/Mongolia/1/2010(H5N1) および A/duck/Hokkaido/WZ83/2010(H5N1)は、共に遺伝子型2.3.2に区分され、2009年モンゴルの野生水禽から分離されたウイルスと近縁であった。動物試験の結果、これらのウイルスは共にニワトリに致死的な病原性を示すが、アヒルは全身感染後、耐過することがわかった。中国の家禽で高病原性鳥インフルエンザの防疫が徹底されておらず、H5N1ウイルスが環境中に蔓延し、野生の水禽に感染が広がっていることがわかった。特に、2010年10月に北海道で北から渡ってきたカモの糞からH5N1ウイルスが分離されたことは、本ウイルスが夏季にシベリアの営巣湖沼で受け継がれ、秋の渡りのシーズンに日本に運ばれたと考えられる。ヒトへの感染リスクを下げるためにも、家禽における鳥インフルエンザ対策を徹底し、野鳥の間でH5N1ウイルスが定着することを阻止しなければならない。

2) 河岡義裕

ヒト気管支上皮細胞でよく増えるヒト分離 H5N1 ウイルスとあまり増えない鳥分離 H5N1 ウイルスのリアソータントの増殖性比較により、PB2 蛋白質の 591 番目のアミノ酸(立体構造上、627 番目のアミノ酸のすぐ隣)がリシンであることが、ヒト呼吸器上皮細胞での増殖性に重要であることが明らかになった。さらに、鳥分離 H5N1 ウイルスの PB2 蛋白質の 591 番目をグルタミンからリシンに変えることにより、マウスにおける病原性が顕著に高くなった。また、パンデミック(H1N1) 2009 ウイルスは、リシンと同じく塩基性アミノ酸のアルギニンであったことから、591 番目を鳥型であるグルタミンに置換したウイルスを作製し、フェレットにおける伝播性比較を行ったところ、PB2 蛋白質の 591 番目のアルギニンは、フェレットにおける増殖性に重要であることが明らかになった。さらに、X 結晶構造解析

により、591 番目の変異は、すぐ隣に位置する 627 番目での変異とは異なる構造変化をとりうることが明らかになった。

PB2 蛋白質の 591 番目のアミノ酸が、塩基性アミノ酸(リシンまたはアルギニン)であることは、インフルエンザウイルスのヒトにおける効率のよい増殖性に関与することが示唆された。このことから、PB2 蛋白質の 627 番目や 701 番目のアミノ酸変異のみならず、591 番目のアミノ酸変異も、パンデミックを起こしうるウイルスのリスク評価をする際に注目すべきであると考えられる。

2) 長谷川秀樹

成人ボランティア 5 名に A/Uruguay/716/07 (H3N2) の三倍濃縮スプリットワクチンを 3 週間間隔で計 5 回経鼻接種 (45 µg HA/500 µl 接種) した。ワクチン接種開始より継続的に血清と鼻腔洗浄液を回収し、中和抗体価と HI 抗体価の測定を行った。被験者の現行皮下接種型ワクチン接種歴および感染履歴が異なるため、試験開始直前における機能的抗体レベルに差異はみられるものの、接種回数に応じて中和抗体価および HI 抗体価が上昇することが示された。

欧州医薬品審査庁 (EMA) の定める現行の皮下接種ワクチン有効性判断基準は、18 歳から 60 歳の健常被験者において、①ワクチン接種後の血清 HI 抗体価の幾何平均値がワクチン接種前に比べて 2.5 倍より大きいこと、②ワクチン接種後に血清 HI 抗体価が 4 倍以上の陽転を示した被験者の割合が 40%より多いこと、③ワクチン接種の血清 HI 抗体価が 40 倍以上を示す被験者の割合が 70%より大きいこと、の 3 項目においていずれかの一つを満たすことである。我々は、経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの接種において、鼻腔洗浄液又は血清において同等の有効性基準を満たすことが好ましいと考える。

そこで、まず年齢制限を満たす被験者 4 名の血清 HI 抗体価を EMA の有効性判断基準に当てはめたところ、5 回目のワクチン接種後に①の HI 抗体価幾何平均値の条件を満たす (GMT ratio=2.83) ことが示された (表 1)。また、この有効性判断基準を中和抗体価に当てはめた場合、

4 回目のワクチン接種後に①～③の三つの条件を満たすことが明らかになった。

次に、鼻腔洗浄液の評価を行った。今回の研究における鼻腔洗浄液の回収法で得られたサンプルに関して、黒野等によって示された鼻腔粘膜中の総タンパク量、各抗体量 (Kurono Y, Mogi G. 1987. *Secretory IgA and serum type IgA in nasal secretion and antibody activity against the M protein. Ann Otol Rhinol Laryngol* 96(4):419-424) の値と比較した。

その結果、本研究で回収される鼻腔洗浄液の総タンパク量を 1 mg/ml にした時に、生理的条件下にある IgA 抗体量 (約 2.21 mg/ml) の 1/10 量が含まれることが明らかになった。これに従い、得られた鼻腔洗浄液サンプルの総タンパク量を一律 1 mg/ml に調製した時の鼻腔洗浄液中の中和抗体価と HI 抗体価を測定した。鼻腔洗浄液の中和抗体価は、血清と比較してワクチン接種に伴い速やかに上昇することが示された。血清同様に、この中和抗体価を EMEA の基準に当てはめた場合には、2 回目のワクチン接種後に①～③の有効性判断基準の三つの項目を満たすことが明らかになった (表 2)。鼻腔洗浄液を用いた HI 抗体価は、サンプルの都合により全てに関して測定はできなかったが、血清と同様に HI 抗体価は中和抗体価の値より 2～4 倍低い値で相関することが明らかとなった。

本研究において、成人ボランティア 5 名に三倍濃縮スプリットワクチン (A/H3N2) を計 5 回、3 週間隔で経鼻接種 (45 µg HA/500 µl 接種) し血清および鼻腔洗浄液のワクチン原株に対する中和抗体価と HI 抗体価を測定した。経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの有効性を評価する基準は現存在しないが、少なくとも鼻腔洗浄液又は血清の抗体価の評価に現行の皮下接種型ワクチンの有効性判断基準が参考になる。得られた結果を EMEA の評価基準に当てはめると、血清 HI 抗体価の幾何平均値のワクチン接種前後の比が 2.5 倍より大きいこと、の 1 項目を満たした。季節性ワクチンの有効性評価では 3 項目中少なくとも

も一つを満たすことが求められるため、判定基準をみたしたことになる。

しかしながら、実際の有効性判断には 18～60 歳の健常被験者が最低でも 50 名必要とされるため、現在国立感染症研究所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、50 人規模での試験研究を既に開始し解析中である。また、中和抗体価と HI 抗体価の相関性は血清と鼻腔洗浄液で同じであることから、血清に対する EMEA の判断基準をもとに、鼻腔洗浄液に関して HI 抗体価あるいは中和抗体価を測定することで有効性判断基準の作成が可能であることが考えられる。最後に、今後規模の大きい臨床試験などに対応できるように、簡便な鼻腔洗浄液サンプル調製方法の確立が必要であると考えられる。

4) 西藤岳彦

2005 年以降、世界的に薬剤耐性株の大流行がみられ、大きな問題となっている。動物由来の新型インフルエンザが流行した際に、このウイルスが薬剤耐性であった場合には、現行の新型インフルエンザ行動計画などで措置している対応はほぼ不可能となるので、これらの可能性を評価した。

2007 年から 2008 年にかけて、一都一道一府五県で分離された馬 II 型インフルエンザウイルス 13 株の NA 遺伝子の翻訳領域の塩基配列 (1410 塩基) を決定し、推定アミノ酸配列 (470 残基) を決定した。13 株間の塩基配列は高い相同性を示し、相互に 99.7% 以上の相同性であった。推定アミノ酸配列に関しては、完全に保存されていた。馬 II 型インフルエンザウイルスのプロトタイプである Eq/Miami/63 株との比較では、塩基配列の相同性は 91% であり、アミノ酸配列のそれは 93% であった。NA タンパク質の酵素活性を担う頭部領域において、Eq/Miami/63 株と 07/08 分離株との間で 32 個のアミノ酸置換が認められた。

推定アミノ酸配列をもとに、N1, N2 亜型 NA で知られている NA1 耐性に関与するアミノ酸置換の有無を検索した。その結果、N1 亜型耐性株に認められる H274Y, N2 亜型に認められる E119V, R292K,

B型 NA に認められる R152K, D198N などの耐性獲得に関連するアミノ酸置換は認められなかった。

Eq/Miami/63 株および国内分離株 13 株の Oseltamivir 活性体(GS4071)および Zanamivir の 50%酵素活性阻害濃度 (IC₅₀) も測定した。GS4071 に対する IC₅₀ は、07/08 発生株と Eq/Miami/63 の間で大差がなく、H1N1 亜型 A/Texas/36/91 の約 2.5 倍であった。一方、Zanamivir に対する IC₅₀ は、A/Eq/Miami/1/63 が 4.3nM であったのに対して、13 株の平均は 18.3nM と高い値を示した。H1N1 亜型 A/Texas/36/91 のザナミビルに対する IC₅₀ は、1.1nM であった。

5) 鈴木康夫

1. 合成シアロ糖鎖ポリマー、抗 H5 モノクローナル抗体およびイムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識 (Neu5Ac α 2-3Gal or 2-6) を簡便かつ迅速に測定するキット「軽量 (約 5 グラム)、反応時間 15 分で完了」を開発した。さらに高度化かつ適用範囲の拡大を目指す「現状では 16HA のウイルスが必要」。
2. ブタの上気道、下気道、肺における N-グリカンの詳細な解析を行い、ブタの呼吸器には、ヒト型シアロ糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-) が鳥型シアロ糖鎖レセプター (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-) に比べ 3~5 倍多いことを見出した。
- 6) H5N1 ウイルスに感受性である動物 (ネコ、イヌ、トラ、ニワトリなどの家禽) におけるレセプターシアロ糖鎖の分布をレクチンを用いて調べた。その結果、ニワトリ個体からヒトへの適応性を獲得した変異 H5N1 が発生する可能性を見出した。
3. ラオス人民民主主義共和国における H5N1 分離株にヒト間伝播可能な変異および NA 阻害剤抵抗性株を発見した。
4. タイ国で分離されたブタ H1N1 のレセプター結合特異性はヒト型レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal) 結合性であるが、別の宿主である発育鶏卵しょう尿液中で培養すると鳥型レセプター (Neu5Ac2-3Gal) 結合性変異を獲得することを見

出した。

5. 1918 年に発生したスペインインフルエンザの病原性発現にウイルスノイラミニダーゼスパイクの細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸性安定性が関わることを発見した。この機構は次期パンデミックインフルエンザウイルスの発生監視技術開発に有用である。

6. 日本産の梅から古式法により製造される梅肉エキスに存在する新物質ムメフラールは、多様な抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。本分子は、Pandemic Influenza (H1N1) 2009 ウイルスに対しても効果的であった。

7. インドネシアブタから分離された H5N1 にヒト型レセプター (Neu5Ac α 2-6Gal) への結合性を獲得した株を見出した。

8. インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼスパイクの機能 (シアリダーゼ活性) を阻害する新しい分子を合成し、その活性を見出した。これは、シアル酸の誘導体で、C9 N-acyl Neu5Ac2en の構造を持つ。これは、これまで臨床に使われている 4-guanizino-Neu5Ac2en (ザナミビル) に匹敵する強力な抗シアリダーゼ活性を持つことを見出した。

2. 新型インフルエンザ (H1N1) 2009 のリスク評価と対応に関する研究

各分担研究の結果概要については、以下のとおりである。

1) 小田切孝人

1. A/H1N1pdm09 (パンデミック A/H1N1) ウイルスによる評価。

ワクチン株 A/California/7/2009 接種後のヒト血清抗体について、最近の孵化鶏卵分離株 A/Chirstchurch/16/2010 との反応性を幾何平均抗体価 GMT をもとに比較検討した。A/Chirstchurch/16/2010 は成人層および老人層いずれにおいてもワクチン株の GMT の 150% と高い交叉反応を示し、ワクチンが有効に作用することが示された。

2. A/H3N2 ウイルスによる評価。

ワクチン株 A/Victoria/210/2009(X-187) 接種後のヒト血清抗体について、孵化鶏卵分離のワクチン類似株および MDCK 細胞分離のワクチン類似株および抗原変異株との反応性を調べた。その結果、X-187 で得られる GMT はひじょうに高く、最近の流行株との GMT と比較すると、孵化鶏卵分離、MDCK 分離いずれも、有効交叉反応性の目安となる 50%以下であった。そこで、孵化鶏卵分離の代表株 A/Rhode Island/1/2010 の GMT を基準に評価したところ、孵化鶏卵分離株は 70%と高い交叉反応性を示したが、MDCK 細胞分離株は、40~60%程度と低い反応性であった。このことから、孵化鶏卵に馴化したワクチン株で得られたヒト免疫抗体は、ヒトの流行株を反映している細胞分離株との反応性が低下していることから、ワクチンの効果が減弱していることが懸念された。

3. B 型ウイルスによる評価。

B 型ワクチン B/Brisbane/60/2008 接種後のヒト血清抗体について、ワクチンと同一のビクトリア系統でワクチン類似株である孵化鶏卵分離および MDCK 細胞分離の B/広島/9/2010 株について、反応性を調べた。その結果、MDCK 細胞分離の B/広島/9/2010 株は、ワクチン株に対して 150%の GMT を示し、孵化鶏卵分離株は 55%GMT であった。このことから、B 型ワクチンにおいては、孵化鶏卵への馴化による交叉反応性の低下の問題は無いことが示唆された。一方、異なる山形系統の孵化鶏卵分離株 B/Wisconsin/1/2010 は 60%GMT であり、山形系統ウイルスが流行した場合は、ワクチン効果は期待できないことが示された。

ワクチン接種後のヒト血清の流行株に対する交叉反応性の評価成績は、ワクチン株の変更の有無を判断する上で、有用な情報となる。この解析により、A/H3N2 亜型では、孵化鶏卵に馴化したワクチン株で誘導されるヒトの免疫抗体は、流行株との反応性が低下する可能性が指摘された。この問題を中和試験などでも評価し、

同様の成績が得られるか検討が必要である。一方、A/H1N1pdm09 亜型および B 型ワクチンではそのような問題は起こらず、ワクチンの有効性が期待できる。ワクチンの製造基剤として孵化鶏卵を使わざるを得ない現状では、A/H3N2 ワクチンで見られる問題点は、今後も毎年起こり得ることであり、できるだけ早い培養細胞ワクチンの導入が必要である。

2) 押谷 仁

1 : タミフル耐性新型インフルエンザウイルスのスクリーニングとして NA 遺伝子の 275 番目の histidine から tyrosine の変異 (H275Y) を特異的に検出する reverse transcriptase PCR/restriction fragment length polymorphism (RT-PCR/RFLP) assay を確立した。2009 年に仙台市内で分離された新型インフルエンザウイルス 133 株でスクリーニングを行ったが、すべてタミフル感受性であった。

2 : 新型インフルエンザに対する不顕性感染を調査するため、医療従事者を対象としたコホート調査をおこなった。不顕性感染の割合は、ウイルス分離で 14.3%、HI 試験で 20.0%、中和試験では 50.0%であった。今後の感染症対策を考える上で医療従事者の不顕性感染は非常に重要な要素であると考えられる。

3) 岡部信彦

平成 22 年 (2010 年) 3 月から平成 23 年 (2011) 2 月までの電話相談は総計 927 件であり、インフルエンザは 104 件 (11%) を占めた。前年度の調査結果で、月別にみ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に相談件数が増加していることがわかったので本年度は全感染症の相談時期と内容および報道の関連性を検討した。その結果、毎月照会の多かった上位 2 位についてはメディア報道に影響を受けていることが示された。月別疾患別の相談件数は 963 件であり 6 月、9 月、11 月が多かった。相談窓口の対象は医療機関、行政機関であるが実際には多くの職

種から問い合わせがあった。主婦 (25.1%) が最多で、次に医療従事者 (24.6%)、企業 (24.3%)、無職 (9.6%)、行政機関 (8.6%)、教育関係 (6.9%)、メディア (0.9%) であった。相談者の年齢分布では、30代、40代が最も多く次に50代、60代、20代、70代の順であった。これは前年度と同じ傾向であった。性別相談件数では、女性 (56.6%)、男性 (43.3%) であった。これは前年に比べて男性の相談件数が大幅に増加した。都道府県別の相談件数は東京都が最も多く、次いで埼玉、神奈川、千葉県であった。次に大阪、兵庫、愛知県であった。相談が無かった県は岩手、山形、鳥取、佐賀県であり前年の2県に比べ本年は4県に増加した。

また、厚労省での電話回答で満足が得られない、あるいは感染研に回されたという意見も寄せられた。全感染症の相談対応には高い専門性が求められ正確な情報をわかりやすく伝えることが必要であるため感染症相談窓口は今後、感染研に一本化して強化することが望ましいと思われる。

4) 高橋宜聖

(1) ヒト末梢血記憶 B 細胞と T 細胞の分離

血清 HI 抗体価陰性のドナー末梢血単核球から、T 細胞と記憶 B 細胞を分画した (図 1)。T 細胞は CD3 をマーカーとして、記憶 B 細胞は、CD27 と CD19 をマーカーとして使用した。

(2) H1N1pdm 不活化粒子に対する交差記憶応答の測定

T 細胞と記憶 B 細胞、あるいはコントロールとして T 細胞のみを 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 抗体価を測定した (図 2)。すると、記憶 B 細胞を移植したマウスにおいて抗 HA 抗体価が検出され、記憶 B 細胞分画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。

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ている。また、新型インフルエンザウイルス罹患患者から HA に結合するモノクローナル抗体を作製したところ、季節性ウイルスの HA に交差反応性を示す抗体が含まれていたことから、季節性インフルエンザウイルスにより誘導された記憶 B 細胞の一部が交差反応する可能性が指摘されている。本研究でヒト免疫応答を再構築したマウスを用いた結果から、少なくとも記憶 B 細胞の一部が新型ウイルスへの交差性に関与する事が確認された。今後、新型インフルエンザワクチン接種者において産生されたモノクローナル抗体を作製し、その中和活性や HA 結合部位を詳細に解析する事により、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事が必要と考えられる。

D. 考察

本年度における本研究の意義と目的は、以下のとおりである。

(1) 弱毒型の (H1N1)2009 インフルエンザ大流行では健康被害と社会的影響は軽微だったが、強毒型 H5N1 鳥インフルエンザが新型インフルエンザとして大流行した際には、未曾有の健康被害と社会機能の麻痺・崩壊が予想される。従って、軽微から重篤なものまで幅広いパンデミックを規定する科学的基盤の解明と、それに応じた発生予測、早期検知、リスク評価が必要である。

(2) 最悪のシナリオにおけるパンデミック時の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、新型インフルエンザの発生予測、早期検知、リスク評価方法を確立し、事前準備と緊急

対策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。

1. 様々なシナリオにおける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早期検知監視体制と様々なシナリオにおけるリスク評価方法の確立
3. 新型ウイルス迅速診断キットの開発・改良・実用化
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. 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

これらの成果を活用して、健康危機管理、社会危機管理体制の整備が進み、最悪のシナリオにおける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応用される。

また、各分担研究者の研究成果の概要は以下のとおりであり、ほぼ研究目的を達成できたと評価される。

- (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。H5N1 は徐々にブタ型ないしヒト型に変化しており、またブタにおける不顕性感染が確認されたことから、新型インフルエンザへの進展と、ヒトに対する高病原性が維持される可能性がある判断された。
- (2) 国内外の野鳥から多数のインフルエンザウイルスを分離同定し、起源と由来を同定した。越冬で北から飛来する野鳥が H5N1 を持っていたことから、H5N1 は北極圏に定着したと判断された。
- (3) 鳥ウイルスのブタ型、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。

- (4) インドネシア・中国で鳥型 H5N1 ウイルスがブタに不顕性感染しており、ヒト型への変化が危惧される。
- (5) H5N1 および H1N1 pdm ウイルスが識別する動物とヒトのレセプター認識変異の簡便測定技術を開発し、パンデミック発生を監視できる可能性を得た。
- (6) 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。
- (7) 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。
- (8) ブタ由来 H1N1pdm ウイルスのウイルス性状、遺伝子構造、病原性、抗原性、エピトープ、抗ウイルス剤感受性、病態解析、動物実験を行い、病原性、伝播性、薬剤耐性等の分子基盤を解明した。H1N1pdm は 4 種類のブタウイルスの交雑体で、弱毒型であるが、季節性ウイルスよりは若干病原性が強く、多くのトリ型ウイルスの性状を保持し、未だ十分にヒト型には変化していないことを示した。これらに基づき、健康被害と社会的影響に対するリスク評価と流行予測、緊急対応方策を提言した。診断キット、新型ワクチンを開発した。
- (9) H1N1pdm の国内のブタへの感染を確認し、リスクを評価した。
- (10) H5N1 および H1N1 pdm ウイルスのリア

ルタイム RT-PCR による診断系を開発し、検疫所、地方衛生研究所へ技術移転し、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した。

- (11) オセルタミビル耐性株の全国緊急調査を行った。2007/08 年では A/H1N1 の耐性変異 (H275Y) は 2.6% と低く、08/09 年には 99% となった。H1N1pdm の耐性は 1.2% と低頻度で、拡大傾向はなかった。耐性株はザナミビル感受性でワクチン株と同じ抗原性であった。
- (12) 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 抗体惹起能が高く、抗 HA 抗体と協調的に感染防御に寄与していた。
- (13) 新型ワクチンには強い交叉免疫を賦与する経鼻ワクチンが望ましい。安全・有効な天然物由来粘膜アジュバントを探索し、2 重鎖 RNA および 4 種類のキノコ菌糸体抽出物の有効性を確認した。マウスとサルにおいて、H5N1 全粒子経鼻アジュバント添加不活化ワクチンは、異なる clade の H5N1 感染に対し交差性の防御効果を示した。
- (14) H5N1 に対し十分な事前準備対応が不可欠で、他の亜型の新型インフルエンザにも対応可能と判断された。特に、H5N1 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。

(H1N1) 2009 パンデミックは、弱毒性のウイルスによるもので、健康被害は比較的軽微に終始した。これに対して、予め検討され準備されていた計画に沿った適切な対応がなされず、対応には柔軟性を欠き、多くの混乱が生じた。ここで第 1 に反省すべきは、我が国における健康危機管理体制が全くと言ってよいほど機能していないことである。予め決定され、準備されていた計画がほぼ完全に反故にされただけでなく、感染症対応には素人である政治家などの思いつき、思惑によ

って、方針や支持が二転三転し、現場や地方には大きな混乱と不信感が生じてしまった。

十分に事前準備されておれば、実際の健康危機事態における緊急危機対応は基本的には技術レベルの問題であり、政治体制、政権、行政トップの思惑などにより左右されてはいけないはずである。しかし、これが大きな影響を受けるとともに、技術系行政担当部署が本来の責任を十分に果たせなかったことは、危機管理体制そのものに大きな欠陥があるに違いない。個々の項目における対応についての評価、反省も重要であるが、まず第 1 に反省すべきは、国の危機管理に関する根本的な方針が確立されておらず、その準備も不十分であり、実効性にも大きな問題があった点である。しかし、現時点では、この根本問題の原因を究明し、どこをどのように変える必要があるのか、それには何をどのように行うべきなのかといった議論が全くなされていない。

新型インフルエンザのみならず、感染症大流行による重大な健康危機は必ず繰り返されるものなので、国の危機管理体制の再構築、確立は最大の緊急課題の一つである。最悪のシナリオにも対応できる十分な事前準備と緊急対応体制の構築が必要である。これを怠れば、将来に禍根を残すこととなり、不作為の責任を問われても致し方あるまい。

一方、今回のパンデミックから反省すべき重要問題の一つは、なぜブタ由来の H1N1pdm ウイルスによるパンデミックが予想されなかったのか、またヒトの世界で流行を始める前になぜブタの中で検知されなかったのかという点である。もし、数か月前にブタの中で検知され、流行状況、ウイルスの性状、病原性などが解析され、適切なリスク評価がなされていれば、早期警戒警報の発令、ヒトの世界への侵入阻止手段によるパンデミックの回避が可能であったかもしれない。また、ウイルスの性状が予めわかっていたら、診断法の事前開発、ワクチンの事前開発・事前製造・臨床試験の事前実施、ワクチン先行接種などの有効な手段が取れていた可能性も高い。さらに、不必要な

緊急対応を実施することなく、より適切かつ効率の良い必要十分な緊急対応手段を講じたであろう。今後繰り返されるに違いないパンデミックを回避し、または健康被害と社会・経済的影響を最小限に留めるためには、この反省に基づいた対応体制の構築が必要である。

事前に動物（今回の場合にはブタと考えられる）において、新型ウイルスが検知されなかった理由は、世界のほとんどすべての国において、ブタにおいてはインフルエンザの監視が実施されていないことである。また、H5とH7を除いては、家禽のインフルエンザは報告されないことである。これでは、ヒトの新型インフルエンザの先祖となる可能性のあるウイルスが把握されず、また報告されないために、新型インフルエンザ出現のリスク評価も、健康被害の予測も不可能とならざるを得ない。

ブタにおいては、トリや多くの動物、ヒトなどとは異なり、弱毒性のインフルエンザはもとより高病原性 H5N1 ウイルスが感染しても、致死的な病気にはならず、通常は軽度の呼吸器疾患や不顕性感染に終始する。そのため、どこの国においても、養豚業者や農政担当部局にとって、ブタのインフルエンザは重要な疾患とは捉えられておらず、監視に対する熱意は低い。一方、ブタにおけるインフルエンザの検査を実施すれば、ブタ型ウイルスやヒトの季節性インフルエンザを含む様々なウイルスが検出されてくる可能性があり、無用な風評被害が起こって経済的な影響も懸念される。従って、畜産・農業分野においては、積極的にブタにおけるインフルエンザの監視を実施することが考慮されることはなく、むしろ余計なことをしてくれるなどの反対意見も強い。

さらに、もしブタにおいてヒトのパンデミックの可能性のあるウイルス（例えば高病原性 H5N1 や H7N7 など）が検出された際には、どのような対応を取るべきなのかも国内外において明確には規定されていない。その場合には、ブタそのものには健康被害はないとしても、接触する農家には感染の危険もあり、さらに周囲への伝播拡大や

新型ウイルスへの進展も危惧される。家禽の場合と同様に、広範囲の隔離、検疫、移動制限、さらには屠殺も考慮すべきなのか、実施すべきなのかについての議論はほとんどない。

一方、家禽においては、高病原性鳥インフルエンザウイルスとされる H5 と H7 亜型（農水省による定義では、強毒型のみならず、弱毒型も同様に殺処分、移動制限などの対応の対象となることから、すべての H5 と H7）については、OIE 規則や家畜伝染病予防法によって厳しい対応がなされている。しかし、それ以外の亜型ウイルスについては、家禽への健康被害が生じないか無視できることから、感染事例に関する報告の義務はない。たとえ検出されても報告されることもなく、報告されたとしても特別の対応は執られていない。

しかし、このようなトリやブタのインフルエンザは、ヒトへの感染原として、また新型インフルエンザ出現への直近のウイルスとして、公衆衛生にとって無視できないばかりか、非常に重要な問題である。新型インフルエンザ出現のリスク評価、流行程度や健康被害の予測などは、これらの動物インフルエンザの流行疫学状況やウイルスの性状などに関する情報無しには不可能である。また、先に述べたように、未だ動物のインフルエンザに留まっている間に、そこで封じ込め、ヒトへの侵入を阻止することが望ましいことは言うまでもない。この際に、敵の存在とその本体を知らなければ対応は不可能であろう。さらに、ヒトの新型インフルエンザが出現した場合も、先まわって、診断法やワクチンの準備を進めておけば、流行拡大を抑え、健康被害の発生を最小に留めることにも可能性が出てくる。

では、トリやブタなど動物のインフルエンザに対する監視モニターをどのように実施させるのかが大きな問題となる。インフルエンザは人獣共通感染症の代表であり、動物の健康はそのままヒトの健康に直結する。まさに「One flu, One health」なのであり、その病原体であるインフルエンザウイルスは動物とヒトに共通のウイルスである。これを境の無い一つの問題として捉え、

お互いの壁と超えた協力関係の構築が、インフルエンザ問題の解決には必須な作業である。

現在、FAO, OIE, WHO が協力して、「One flu, One health」の合言葉のもとに、animal sectors と public health sectors を横断的に統合するような総合的インフルエンザ対策の実施体制の構築を検討している。

我が国においても、このような取り組みが必要であり、官庁部局の壁を越えた協力体制の確立を目指す必要がある。

F. 健康危害情報

A(H1N1) pdm ウイルスは弱毒型であり、免疫学的にも季節性 H1N1 ウイルスと交差する免疫学的性状を持つ。従って、H5N1 で予想されるような膨大な健康被害や壊滅的な社会的影響は生じない。

一方、H5N1 強毒型の新型インフルエンザ出現のリスクは減っておらず、これから新型ウイルスが出現した際の影響を考慮すると、最悪の状況に備えた十分な事前準備と緊急対応計画を再検討し、早急に十分な準備をすすめることは必須である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ichinohe, T., Aina, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J. Med. Virol.* 82: 128-137, 2010.

Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. *Epidemiological, antigenic and genetic characteristics*

of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 67-71, 2010.

Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Aoki, Y., Suto, A., Abiko, C., Sanjoh, K., Sugawara, K., Takashita, E., Itagaki, T., Katsushima, Y., Ujike, M., Obuchi, M., Odagiri, T., Tashiro, M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virology J.* 7:53, 2010.

Ichinohe, T., Aina, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H., Ichinohe, T. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* Volume 82; 1754–1761, 2010

Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. *Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses*

A(H1N1)during the 2007-2009 Influenza Seasons, Japan. Emerg. Infect. Dis. 16; 926-935, 2010

Oakley, A J., Barrett, S., Peat, T.S., Newman, J., Victor A., Streltsov, V. A., Waddington, L., Saito, T., Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J. L. Structural and functional basis of resistance to neuraminidase Inhibitors of Influenza B viruses. Med. Chem. 2010. DOI: 10:1021/jm 100621s

Kuroda, M., Katano, H., Nakajima, N., Tobiume, M., Aina, A., Sekizuka, T., Hasegawa, H., Tashiro, M., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Hata, S., Watanabe, M., Sata, T.

Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by *de novo* sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS ONE PLoS ONE 5(4): e10256, 2010. (doi:10.1371/journal.pone.0010256)

Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan PLoS ONE 5(6): e11057.

doi:10.1371/journal.pone.0011057

Ikeno, D., Kimachi, K., Kino, Y., Harada, S., Yoshida, K., Tochihiro, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Okada, K., Miyazaki, C., Ueda, K. Immunogenicity of an inactivated, adjuvanted whole-virion influenza A(H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol.

Immunol. 54: 81-88, 2010

Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. J. Med. Virol. 83:10-15 2011

Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M. Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional and real-time RT-PCR assays. Jpn. J. Infect. Dis. (in press, 2011)

Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniel, R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Opp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zambon, M., Public Health Implications of Oseltamivir Resistance: Emergence in Pre-pandemic Influenza A(H1N1) Viruses during the 2007 - 2009 Seasons. Influenza and other respiratory viruses Resp. Viral. Infect. (in press, 2011)

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 分担研究報告書