

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。2010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5,642検体から合計85株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。特に、2010年10月に北海道稚内市大沼のカモの糞から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスA/duck/Hokkaido/WZ83/2010 (H5N1)は、同年5月にモンゴルの野鳥から分離されたH5N1ウイルスと極めて近縁であり、H5N1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。

**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。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。

**C. 研究結果**

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。

#### D. 考察

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。

#### 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、ヒトと動物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。また、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) Isoda N, Tsuda Y, Sakoda Y, and Kida H.

(2010) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. *Arch Virol, in press.*

(2) Feng F, Miura N, Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H and Nishimura S. (2010) Novel trivalent anti-influenza reagent. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 3772-3776.

(3) Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J Biol Chem.*

(4) Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41, 351-357.

(5) Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406, 88-94.

(6) Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. *J Neurovirol* 16, 125-132.

(7) 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. (2010) 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* 39, 58-70.
- (8) 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. (2010) Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
- (9) Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H and Takada A. (2010) Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 5, e8553.
- ## 2. 学会発表
- (1) 「台湾のニワトリから分離された低病原性H5N2インフルエンザウイルスの病原性獲得」曾田公輔、Cheng Ming-Chu、遠藤真由美、吉田裕美、Lee Ming-Shiuh、Lee Shu-Hwae、岡松正敏、迫田義博、Wang Ching-Ho、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (2) 「ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの性状解析」野村直樹、迫田義博、遠藤真由美、吉田裕美、山本直樹、岡松正敏、櫻井健二、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (3) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (4) 「RT-LAMPによるインフルエンザウイルス遺伝子の検出とスクリーニング法としての有用性評価」吉田裕美、迫田義博、遠藤真由美、本島昌幸、吉野史、山本直樹、岡松正敏、副島隆浩、仙波晶、神田秀俊、櫻井健二、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (5) 「モンゴルの野生水禽から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、吉田裕美、佐藤由佳、岡松正敏、Damdinjav Batchhluun, Ruuragchaa Sodnomdarjaa、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (6) 「Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin, A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)」M. Okamoto, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (7) 「H9N2 Avian Influenza Virus Acquires High Pathogenicity by the Introduction of a Pair of Di-basic Amino Acid Residues at the Hemagglutinin Cleavage Site and Consecutive Passages in Chickens」K. Soda, S. Asakura, M. Okamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (8) 「H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice」N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamoto, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (9) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部 第44回夏季シンポジウム (2010年、洞爺湖)
- (10) 「H9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149回日本獣医学会学術集会  
(2010年、東京)

(11) 「豚由来H1N1パンデミックインフルエンザワクチン候補株の選抜」岡松正敏、  
山本直樹、迫田義博、喜田宏 第149回日  
本獣医学会学術集会 (2010年、東京)

(12) 「野生水禽から分離されたインフルエンザウイルスA/mallard/Hokkaido/24/20  
09 (H5N1)の性状解析」山本直樹、本島昌  
幸、吉野史、岡松正敏、迫田義博、喜田  
宏 第149回日本獣医学会学術集会 (201  
0年、東京)

#### H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

「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」  
分担研究報告書

「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」

研究分担者 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

**研究要旨：** 哺乳動物で効率良く増殖するのに重要なアミノ酸として、PB2 蛋白質の 627 番目と 701 番目のアミノ酸変異が知られている。しかし、H5N1 ウイルスの中には、これらのアミノ酸が鳥型であるにもかかわらずヒトの呼吸器細胞で良く増殖する株があり、またパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスも、これらのアミノ酸は鳥型であった。そこで、これまでに知られていない哺乳動物で効率良く増殖するのに必要な変異について解析を行ったところ、PB2 蛋白質の 591 番目のアミノ酸が重要であることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

インフルエンザウイルスのヒトにおける増殖性や病原性は、様々な因子が関与しているが、とりわけ、ウイルスの RNA ポリメラーゼ複合体の1つである PB2 蛋白質の 627 番目や 701 番目のアミノ酸がヒト型であることなどが重要であると考えられている。しかし、H5N1 ウイルスの中には、それらのアミノ酸が鳥型であるにも関わらず、ヒトの呼吸器上皮細胞で良く増える株が存在し、さらに、2009 年に発生し急速に感染が拡大したパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスも鳥型であった。本研究では、PB2 の 627 番目や 701 番目のアミノ酸変異以外のヒトでの効率のよい増殖・伝播に関与する因子の同定を目的とし以下の実験を実施した。

#### B. 研究方法

PB2 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学的な変化を調べた。

#### C. 研究結果

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。

## D. 考察

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。

## E. 結論

今回得られた結果は、今後のパンデミック予測に際し重要な知見となり得る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Ozawa M, Watanabe T, Sakabe S, Li C, Kim JH, Myler PJ, Phan I, Raymond A, Smith E, Stacy R, Nidom CA, Lank SM, Wiseman RW, Bimber BN, O'Connor DH, Neumann G, Stewart LJ, Kawaoka Y. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog* 6:e1001034, 2010

### 2. 学会発表

Shinya Yamada, Masato Hatta, Bart Staker, Shinji Watanabe, Masaki Imai, Kyoko Shinya, Saori, Sakabe, Yuko Sakai-Tagawa, Mutsumi Ito, Makoto Ozawa, Tokiko Watanabe, Chengjun Li, Jin-Hyun Kim, Peter J. Myler, Isabelle Phan, Amy Raymond, Eric Smith, Robin Stacy, Chairul A. Nidom, Simon M. Lank, Roger W. Wiseman, Benjamin N. Bimber, David H. O'Connor, Gabriele Neumann, Lance J. Stewart, Yoshihiro Kawaoka. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. Workshop on the influenza research of J-GRID: The Inaugural Meeting of the Influenza Consortium. Tokyo, 2010, July.

## 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 22 年度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）  
分担研究報告書

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 松本美弥子 萩原敏且 小船富美夫 中山幹男

（国立感染症研究所 感染症情報センター 協力研究員）

**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平成 20 年度（2008 年）1 月より国立感染症研究所、感染症情報センターで開設し平成 22 年度（2011 年）も継続した。平成 22 年度（2011 年 2 月迄）は総計 927 件の電話相談があった。そのうち新型インフルエンザは 45 件（4.9%）であった。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主婦が最も多く（25.1%）、次いで医療従事者（24.6%）、企業（24.3%）、無職（9.6%）、行政（24.3%）、教育関係（6.9%）、メディア（0.9%）であった。前年度のインフルエンザ相談はメディアの影響を受けていることが明らかになったので今回は全感染症についても検討した。また、都道府県別相談窓口利用状況についてみると相談が寄せられなかった県が 4 県あり昨年より 2 県から増加した。

#### A. 研究目的

前年度、新型インフルエンザ発生と同時に厚生労働省（以下厚労省）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確な知識の普及が重要であるという観点から相談窓口を同省内に設置した。我々の相談窓口は感染症情報センター長により国立感染症研究所内に置かれ本年度も継続された。なお、専門性の高い相談に対応することもあり各担当部に連絡を行った。さらに、相談内容とメディア報道と相関性があるかを解析することを目的とした。

#### B. 研究方法

電話相談窓口は年末・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当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。

（倫理面への配慮）

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。

#### C. 研究結果

平成 22 年（2010 年）3 月から平成 23 年（2011 年）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(図1)。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。

#### 相談者の職種

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(図2)。

#### 相談者の年齢分布

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(図3)

#### 性別相談件数

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(図4)。

#### 都道府県別相談件数

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(図5)。

## D. 考察と結論

相談窓口は医療機関、行政機関(教育機関を含む)という限られた範囲であったことから相談件数は多くはないが照会は全感染症にわたり多岐であった。

今季のインフルエンザはほとんど(98%)が新型インフルエンザであったため新型インフルエンザに関しては年度途中の平成22年8月でサーベイランスにおける患者報告が全数把

握から集団発生報告に変更されたため、これに関する照会と新型インフルエンザと季節性インフルエンザワクチンが一本化され製造されることになったことからこれらの問い合わせが増加した。全般的には口蹄疫、NDM-1(ニューデリーメタローβ-ラクタマーゼ産生多剤耐性菌)、カプノサイトファーガ感染症など我が国では希な感染症の出現でこれ等に関する照会が多かった(図1)。地域別相談では東京都など関東地域の相談件数が多かったが都市部で人口が多いこと、大阪、兵庫県など近畿地域では新型インフルエンザの国内最初の集団発生があったことが関係していると推察された。一方、相談の無かった4県については感染症に関心が無いためではなく感染症情報が各県から広報されていたのではないかと思われるが相談窓口(東京)と遠距離電話区域であることも関係しているかもしれない。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。

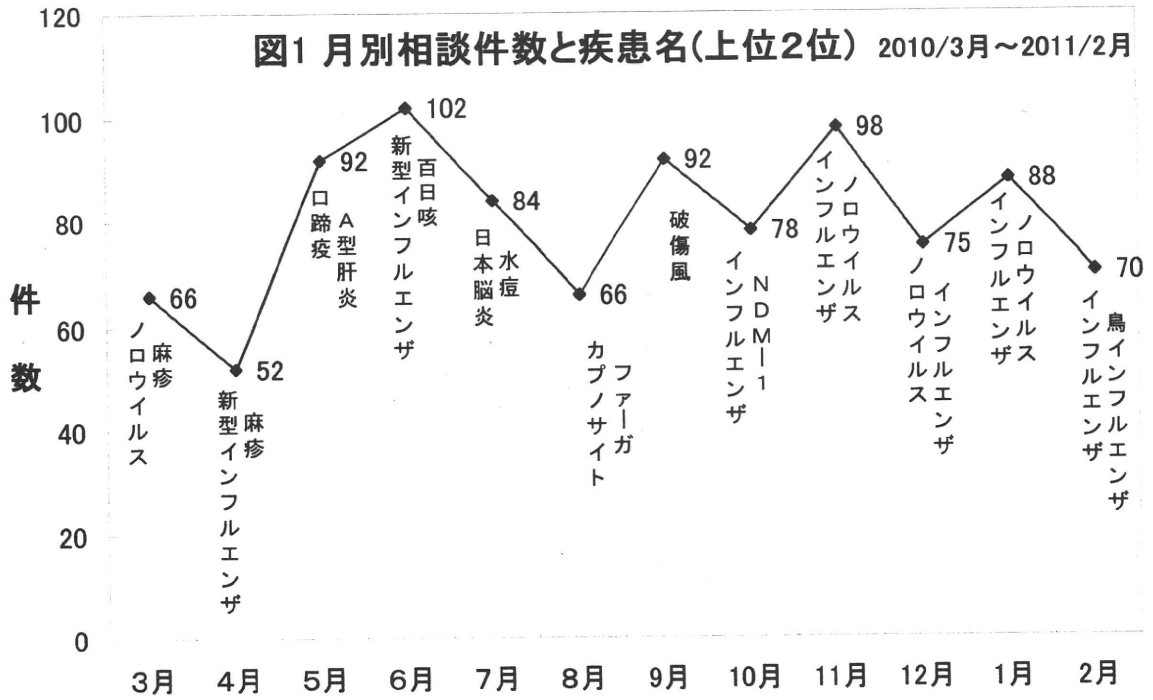
## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

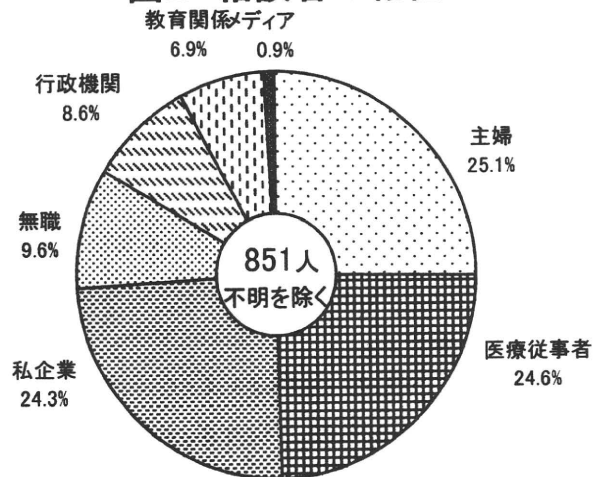
## G. 知的所有権の取得状況

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





### 図2 相談者の職種



### 図3 相談者の年齢分布

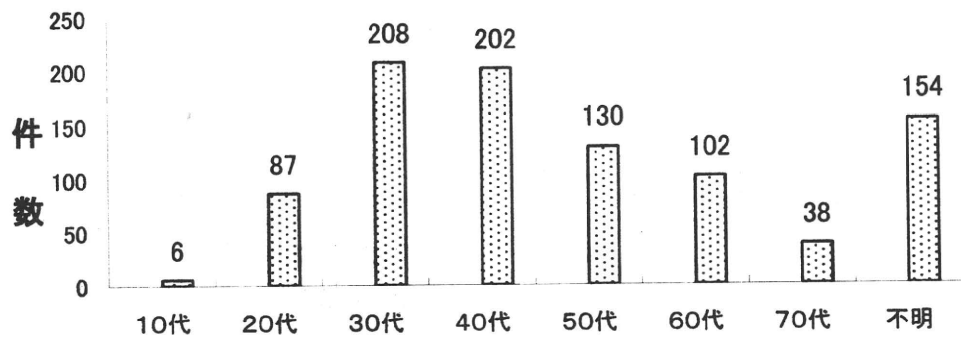


図4 男女別相談件数

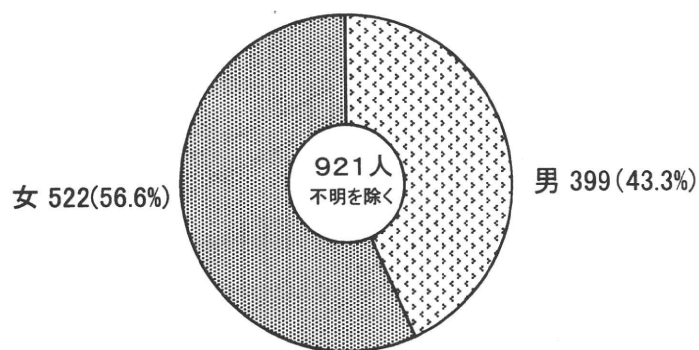
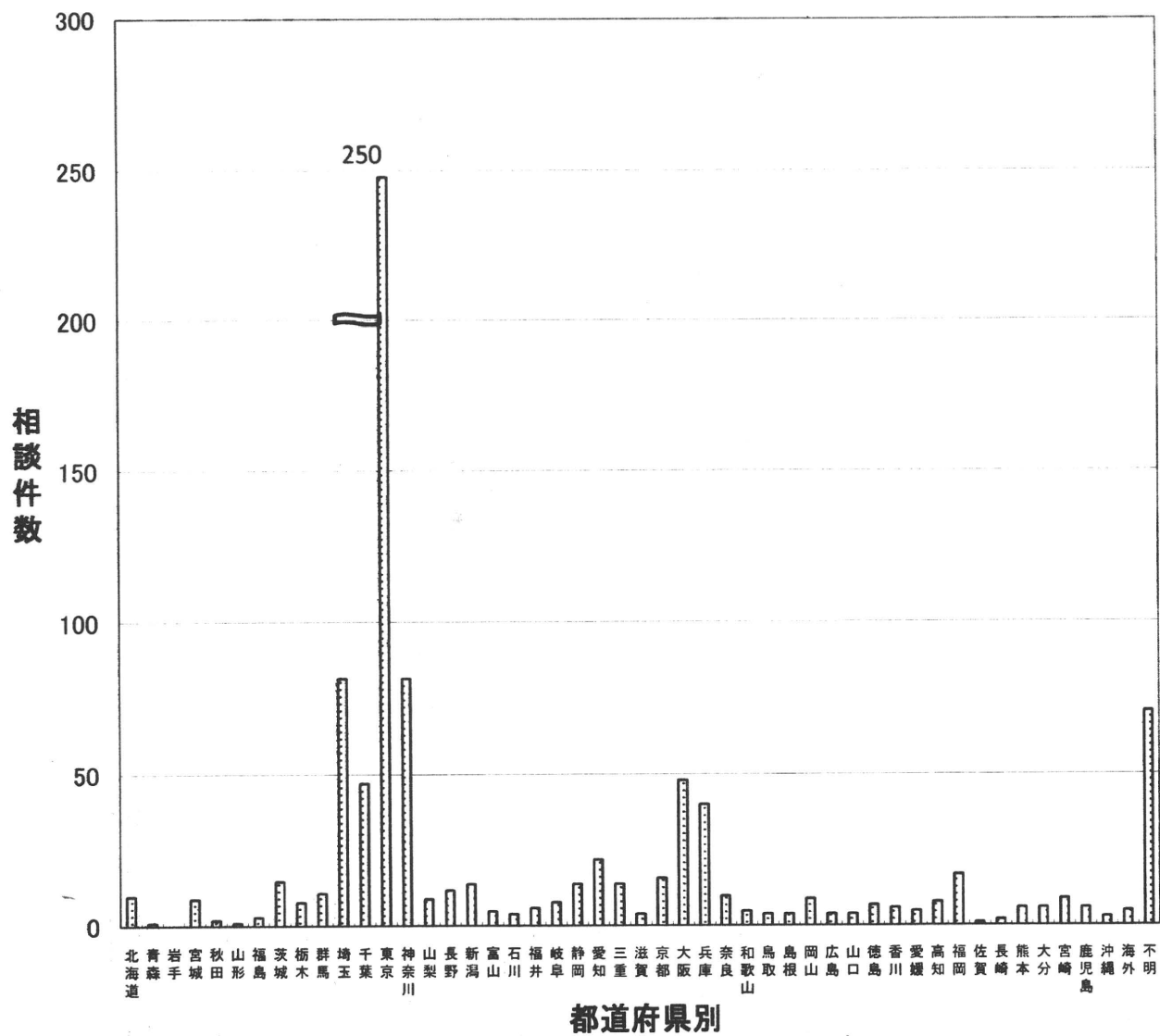


図5 都道府県別相談件数



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

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存在が示唆されている。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に記憶 B 細胞の交差反応性が必須か否か検証した。A/Narita/1/2009 株に対する血清 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。これらリンパ球を移入したマウスに不活化 A/Narita/1/2009 株を接種したところ、抗体価の増加が認められたことから、A/Narita/1/2009 株に対する交差免疫応答は、季節性ウイルスで誘導された記憶 B 細胞が新型ウイルスに交差したことが要因の 1 つとなる可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

ヒト末梢血由来 T 細胞と B 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<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>記憶 B 細胞と CD3<sup>+</sup>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<sup>-/-</sup>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。

## C. 研究結果

(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<sup>-/-</sup>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。

## 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ている。また、新型インフルエンザウイルス罹患者から 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。

## E. 結論

ヒト末梢血由来記憶B細胞とT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応答に記憶B細胞が関与することを明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K., Moriyama, S., Takahashi, Y. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237, 104-116, 2010
- (2) Yuki, N., Takahashi, Y., Ihara, T., Ito, S., Nakajima, T., Funakoshi, K., Furukawa, K., Kobayashi, K., Odaka, M. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. *J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry* Nov 7. [Epub ahead of print] 2010

### 2. 学会発表

(千葉大G-COEシンポジウム、東京、2010年12月)

- (1) 高橋宜聖 「Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs」

[国際学会発表]

(第14回国際免疫学会、神戸、2010年8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 virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling」

- (3) 疋田正喜、加地友弘、高橋宜聖、Klaus Rajewsky、竹森利忠 「IgG1 memory B cell compartment undergoes qualitative alteration after its initial generation early in the immune response.」

## H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

図1 ヒト末梢血記憶B細胞とT細胞の分画

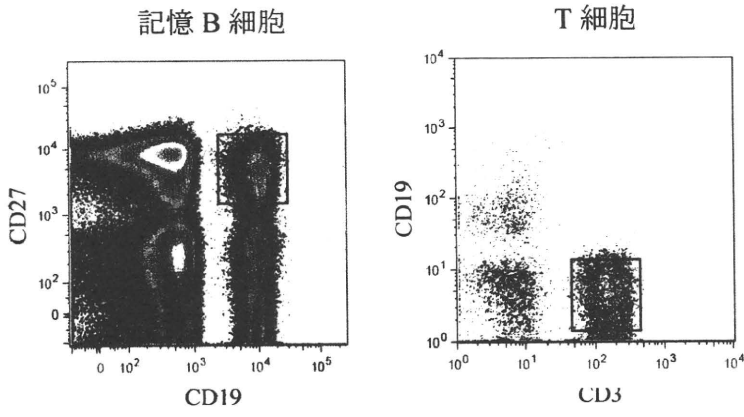
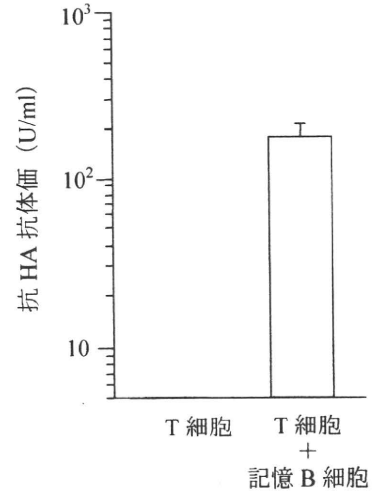


図2 記憶B細胞の交差反応性の測定



「経鼻インフルエンザワクチンの有効性に関する研究」

研究者分担者：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）

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（国立感染症研究所）、奥野良信（一般財団法人阪大微生物研究会）、宮崎隆（東興薬品工業株式会社）、田中伸哉、澤洋文、坂井直樹（北海道大学）、安武義晃（産業技術総合研究所）、新井洋由（東京大学）、千葉丈（東京理科大学）、小淵正次（富山県衛生研究所）

**研究要旨：**経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンは、感染の場となる気道粘膜上に交叉防御能を有する分泌型 IgA 抗体を誘導することで、インフルエンザウイルスの感染阻止に有効である。経鼻噴霧型ワクチンの実用化を目指す一方で、このワクチン接種法の有効性を評価する基準が存在しない事が課題として残されている。経鼻噴霧型ワクチンの有効性判断の為の基礎的なデータの作成を目指し、本研究においては、ヒトの鼻腔洗浄液を用いた評価系の構築と解析を試みた。その結果、ヒトの鼻腔洗浄液を用いた中和抗体価と HI 抗体価の測定に成功し、有効性の評価に有用である事が示された。現行の皮下接種型ワクチンの有効性判断基準と合わせて評価する事により経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの有効性を正しく評価出来る事が期待される。

#### A. 研究目的

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンにより、現行の皮下接種ワクチンで誘導される血中 IgG 抗体に加え、気道粘膜領域に分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫応答が誘導され、感染自体を防ぐことが可能となる。さらに、分泌型 IgA 抗体は交叉防御能が非常に高いため、同じ亜型であれば抗原性の異なる変異株の防御も可能である。したがって、毎年流行を繰り返す季節性インフルエンザや新型インフルエンザウイルスのパンデミックに対する新しいワクチンとして注目され、実用化が待たれている。経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの実用化を目指すにあたり、その有効性に関する評価系が必要となる。インフルエンザワクチン

に関する現行の有効性判断基準は皮下接種型ワクチンに対するものであり、経鼻粘膜投与型ワクチンの有効性を判断する基準は存在しない。本研究課題では、経鼻粘膜投与型ワクチンの有効性に関する判断基準の為の基礎データを作成することを目的としている。今年度は、ヒト鼻腔洗浄液の回収法の確立と、鼻腔洗浄液中の中和抗体価および赤血球凝集反応阻止（HI）抗体価の評価系の構築を目的とした。

#### B. 研究方法

材料と方法：

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 TCID<sub>50</sub> (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。

#### C. 研究結果

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時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 (表 1)。



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。

#### D. 考 察

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。

#### E. 結 論

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの実用化に向けた有効性判断の為の基礎データ作成目指し、鼻腔洗浄液の評価系の構築と解析を試みた。生理的条件下で存在する 1/10 量の分泌型 IgA 抗体を含む鼻腔洗浄液の回収法かつ評価系の構築に成功し、世界で初めて鼻腔洗浄液中の中和抗体価と HI 抗体価の測定に成功した。被験者数 5 名と小規模ではあるが、経鼻粘膜投与型ワクチン接種により少なくとも現行の皮下接種ワクチンの有効性判断基準を満たす可能性が示された。上気道での感染防御には分泌型 IgA 抗体の働きが重要であり、鼻腔洗浄液中の中和抗体価が血清のそれと比較して早期に上昇すること等がヒトで示されたことから、経鼻噴霧型ワクチンの有効性判断基準を作成する上で重要な結果を得ることがで

きた。

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus **J Med Virol** 2010 Oct;82(10):1754-61.
  2. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai 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**. 2010 Apr 23;5(4):e10256.
  4. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. **Jpn J Infect Dis**. 2011 Jan;64(1):40-9.
  5. Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. **Hum Vaccin**. 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
- ### 2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
  2. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎 本邦初の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm)肺炎の剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
  3. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉 新型インフルエンザ (A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した 1 剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
  4. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
  5. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、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によるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  6. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島

7. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  8. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS 発症マウスモデルにおける IFN- $\gamma$  の投与効果 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  9. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応について 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  10. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死感染を起したイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  11. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  12. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  13. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シャペロン阻害剤による Tax と Tax 結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  14. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) の増殖性に関する検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
  15. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
  16. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
  17. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
- 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

表 1. 血清 HI 抗体価と中和抗体価の評価

EMEA 判断基準			pre	1*3w	2*3w	3*3w	4*3w	5*3w
HI	Geometric mean titer <sup>§</sup>	no std.	5	7.07	7.07	8.41	11.89	14.14
①	Mean geometric increase [ post GMT/pre GMT ]	> 2.5		1.41	1.41	1.67	2.38	2.83
②	Seroconversion rate or Significant increase	>40%		0%	0%	0%	0%	0%
③	Seroprotection rate	>70%		0%	0%	0%	0%	25%
中和	Geometric mean titer <sup>¶</sup>	no std.	11.89	16.82	20.00	33.64	47.57	47.57
①	Mean geometric increase [ post GMT/pre GMT ]	> 2.5		1.41	1.68	2.83	4.00	4.00
②	Seroconversion rate or Significant increase	>40%		25%	25%	25%	75%	75%
③	Seroprotection rate	>70%		25%	25%	50%	75%	75%

<sup>§</sup> HI抗体価 <10は、5として算出した。

<sup>¶</sup> 中和抗体価 <10は、5として算出した。

表 2. 濃縮鼻腔洗浄液 中和抗体価の評価

EMEA 判断基準			pre	1*3w	2*3w	3*3w	4*3w	5*3w
中和	Geometric mean titer <sup>¶</sup>	no std.	23.8	40.0	134.5	320.0	380.5	640.0
①	Mean geometric increase [ post GMT/pre GMT ]	> 2.5		1.68	5.65	13.45	15.99	26.89
②	Seroconversion rate or Significant increase	>40%		25%	100%	100%	100%	100%
③	Seroprotection rate	>70%		50%	100%	100%	100%	100%

<sup>¶</sup> 中和抗体価 <10は、5として算出した。