

201028005B

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 20-22 年度 総合研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 23 年 (2011) 3 月

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. 41
	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. 48
	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. 52
	研究分担者：岡部信彦	
	研究協力者：山寺静子、萩原敏且、松本美弥子、小船富美夫、中山幹男、鈴木一義	
	沖縄県における 2009 年度の新型インフルエンザ疫学調査	
	研究分担者：岡部信彦	
	研究協力者：島田智恵、豊川貴生、砂川富正、谷口清洲、古謝由紀子	
4.	インフルエンザワクチン有効性評価法の開発	P. 56
	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.	新型インフルエンザウイルスの感染予防法の	P. 61
	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.	2007/2008 シーズンのわが国におけるノイラミニダーゼ阻害剤耐性株の出現頻度に関する研究	P. 72
	海外における季節性インフルエンザウイルスにおけるノイラミニダーゼ耐性株出現頻度の解析と新規ザナミビル耐性株の発見	
	馬 II 型インフルエンザウイルスの NA1 感受性について	
	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.	ウイルス監視及び、迅速診断法の確立、リスク評価、国際協力	P. 79
	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.	新型インフルエンザ対策のウイルス学的評価、リスク評価	P. 88
	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. 97
	研究分担者：鈴木康夫	
III	研究成果の刊行に関する一覧表 (各報告書の論文発表等参照)	

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、既に東南アジアやエジプトの鳥の間で定着してしまった。さらに、北極圏の営巣湖沼も汚染され、今後渡り鳥の越冬とともに、日本を含む温帯や亜熱帯地域で、毎年 H5N1 鳥インフルエンザの拡大流行が繰り返される可能性がある。人の感染患者も 520 人、死亡 310 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、ウイルス遺伝子の変異によって、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可能性が高いこと、また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拡大しており、危険性は変わっていないこと、さらに、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が起り、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。

他方、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判断される。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。

これらの平成 20~21 年度の研究成果は直ちに厚労省の新型インフルエンザ対策ガイドラインの実施

およびその改定に応用され、平成 21 年 2 月のガイドライン改定、および平成 23 年 2 月の新型インフルエンザ行動計画案の作成に生かされた。さらに WHO によるパンデミックインフルエンザ準備ガイドラインの改定にも応用された。一方、ワクチン緊急開発の成果は備蓄ワクチンの作製に応用された。これらの結果、わが国における新型インフルエンザ対策準備は、特に公衆衛生面において従来に比較して格段に進展したと評価できる。

一方、本研究年度中の平成 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リスク評価を行った。その結果、新型ウイルスは典型的な弱毒型ウイルスであり、病原性を規定する遺伝子は存在しない、抗原的にはブタ型ウイルスと一部共通する、未だヒト型には変化しておらず、ブタ型ウイルスの性状（すなわちトリ型ウイルスのかなりの性状）を維持している、ノイラミニダーゼ阻害薬が有効であることが確認された。さらにその所見などから、流行規模は従来の新型インフルエンザ程度にはなるが、大きな健康被害は起こらないこと、社会・経済的影響も軽度であることが予測された。また、緊急対応としての新型ワクチンについても、1976 年のブタインフルエンザワクチン接種の成績や、ウイルス遺伝子から推定される T 細胞抗原エピートプの共通性などから、適当なワクチン株の選択およびワクチン剤型の在り方を検討した。その結果、アジュバントを用いない季節性ワクチンと同じ剤型のワクチンで十分に免疫を誘導できること、新型 A(H1N1)pdm ウイルスと季節性 H1N1 ウイルスとの間の共通する抗原エピートプの解析から、多くの成人は新型ウイルスと交差する免疫記憶を持つこと、従って、ワクチンの一回接種でも十分な免疫応答が期待できることを予測した。一方、抗ウイルス剤については、アマンタジンには耐性を示すが、ノイラミニダーゼ阻害剤には感受性をもつことを予測した。

さらに、これらの予測について、ウイルス学的に実証作業を進めた。その結果、ウイルス遺伝子の全塩基配列の解析に基づき、これまでの分子疫学、分子ウイルス学の研究成果に基づいたリスク評価を行った結果は、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。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教授

河岡義裕 東京大学医科学研究所大学院教授

岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長

高橋宜聖 国立感染症研究所免疫部主任研究官
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室長

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室長

西藤岳彦 独立行政法人動物衛生研究所グループ長

押谷 仁 東北大学大学院医学研究科教授

鈴木康夫 中部大学生命健康科学部教授

A. 研究目的

2003年後半以来、東アジア地域で発生したH5N1型高病原性鳥インフルエンザの大流行は東南アジア、シベリア、インド、中東、ヨーロッパ、アフリカへ拡大しているが、依然制圧される可能性は無く、何時でも人の世界に新型インフルエンザとして侵入して大流行を起こすことが危惧されている。高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の流行拡大にともなって、偶発的な人の感染例も増加しており、特に現在のH5N1型ウイルスは宿主域が広く病原性が昂進してきているため、人においても60%という高い致死率を示す重症疾患となっている。さらに、ウイルスの遺伝子変異が引き続き起こっており、徐々にヒト型のウイルスに近づきつつあると考えられている。

このような高病原性ウイルスに由来する新型インフルエンザ大流行の場合には、無差別多数の患者、死亡者の発生によって未曾有の健康被害が生じることが危惧される。特に、最も感染リスクの高い医療関係者にも多くの健康被害が生じて

医療サービスの低下などの健康危機が起こることが憂慮される。さらに、これらに起因する交通・物流サービスの低下による食糧やエネルギー供給、一般的な社会サービスなどの社会・経済機能や治安体制の麻痺、破綻、更には社会危機が生じることが懸念されている。

新型インフルエンザ大流行における健康被害を最小限に留め、社会経済機能を維持することは、行政に課せられた大きな責任である。この責任を果たし、社会の要請に応えるためには、予め新型インフルエンザ大流行に対する危機管理計画を作成し、これを実施しておくことが必要である。厚生労働省では、平成17年11月に新型インフルエンザ対策行動計画を発表したが、それに応じた事前準備と大流行時の緊急対応の具体的な行動計画を策定し、新型インフルエンザ健康危機管理体制を確立することが緊急課題である。新型インフルエンザの出現と大流行が危惧されている。その際には未曾有の健康被害と社会機能の麻痺・崩壊が予想される。新型インフルエンザ大流行に備えて、健康被害を最小限にとどめ、社会機能の維持を目的として、事前準備と緊急対策の行動計画の策定とその実施に必要な理論的、技術的な基盤を確立・提供し、危機管理体制の確立に寄与することを目的とした。

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

1. 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法とリスク評価方法の開発
2. 新型インフルエンザ出現の予想方法および早期検知する監視体制の確立
3. 新型インフルエンザウイルス迅速診断キットの開発・改良・普及
4. 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立、およびプレパンデミックワクチ

ンの製造、備蓄、接種方法および品質管理方法の確立

5. 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立
6. 感染病理機構の解明に基づく経鼻投与ワクチン、組織培養ワクチンおよび新規弱毒生ワクチンの開発
7. 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応に関する文献評価
8. 諸外国の新型インフルエンザ計画との比較と情報交換および協体制の推進
9. ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立
10. 飛沫、飛沫核の拡散特性の解明
11. リスクコミュニケーションに関する電話相談窓口

一方、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。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) 新型インフルエンザ出現機序の解明

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

ス伝播機構と、その違いに関わる宿主因子を検討した。

- b) ウイルス糖タンパク側のレセプター結合特性と多くの動物種の宿主細胞側のウイルスレセプターの結合を分子レベル、分子、電子レベルで解析し、宿主域を超えるレセプター要因を検討した。
- c) ウイルス RNA ポリメラーゼ活性発現を促進又は抑制する宿主因子の違いを、鳥、ブタ、ヒトについて解析し、種特異性を規定する宿主要因を検討した。
- d) 水禽類が保有する低病原性鳥インフルエンザウイルスが直接・間接的に人に馴化して、人一人感染能力を獲得する分子機構およびそれを許容する条件を検討した。自然界の鳥ウイルスおよびヒトウイルスの分子疫学的調査と、鳥ウイルスとヒト細胞馴化ウイルス、ヒト分離ウイルスの比較および感染実験による感染標的と病原性の違いを検討した。
- e) 日本およびモンゴルで分離された H5N1 ウイルスについて、ブタへの感染性の違いとその分子基盤を検討した。

2) 新型インフルエンザ出現予測方法の検討

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

3) 新型インフルエンザ出現・流行動向監視体制の確立

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

4) 新型インフルエンザ迅速診断キットの開発

先に SARS 迅速診断用に開発した遺伝子増幅検査法である LAMP 法を全ての亜型のインフルエンザウイルスに応用して、特別な高額機器を必要とせず、迅速、簡便、安価で、感度と特異性の高い診断キットを開発・実用化した。これを地方衛生

研究所、検疫所、医療機関等に配布し、新型インフルエンザの早期検知とモニター、診断体制の整備を検討した。

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

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

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

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

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

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

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

6) ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立

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

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

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

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

8) 次世代の新型インフルエンザワクチンの開発研究

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

この結果、一部にミスマッチをもつ2重鎖 RNA (Ampligen) を添加して経鼻接種すると、局所 I g A 抗体、血清 I g G 抗体、細胞性免疫が誘導された。さらに、接種ウイルスのみならず、抗原的にも大きく異なる別の亜型、別のクレードのウイルスにも、高い交差免疫が誘導できることが示された。

そこで、実用化を目指して、動物を用いた非臨

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

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

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

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

ノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスのモニター方法の確立

新型ウイルスにおいても、薬剤耐性ウイルスが出現することが予想されるので、薬剤耐性ウイルスを能率よく検出できる方法を検討し、国内外におけるこのモニター体制の確立を進め、国内では全国地方衛生研究所の協力によるタミフル耐性モニター体制を確立した。

10) 公衆衛生的な介入及び社会危機管理のための準備と緊急対応のあり方の検討

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

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

これらの結果をもとに、多数の患者が出現する事態における社会危機管理のあり方と緊急対応

の具体的項目を提起した。

11) 諸外国の新型インフルエンザ対策計画の比較検討と国際協力の推進

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

12) 机上演習の企画と実施

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

13) 飛沫・飛沫核の拡散特性の解明

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

各分担研究に関する研究方法については以下のとおりである。

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。

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

2) 2004年から2007年にかけて、ベトナムとインドネシアにて、カモ、ニワトリおよびヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスの正常ヒト気管支上皮 (NHBE) 細胞における増殖性を調べた。更に、リバーシジェネティクス法(プラスミドから人工的にウイルスを合成する方法)を用いて、NHBE 細胞でよく増えるヒト由来株と増殖性の低い鳥由来株の遺伝子交雑体を作製し、どの遺伝子が NHBE 細胞における増殖性に関与するか調べた。また、鳥由来株およびヒト由来株を NHBE 細胞で継代し、増殖性の向上に関与するアミノ酸変異を調べた。

次に、PB2 蛋白質の 627 番目や 701 番目の両アミノ酸鳥型でありながら、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シ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。

3) 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。

1. 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。

2. I 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。

3. H1N1pdm09 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。

22 年度のインフルエンザワクチン接種前後の成人層(平均値 38.1 歳)および老人層(平均値 82.3 歳)それぞれ 24 ペア血清について、ワクチン株および代表的な最近の流行株との反応性を HI 試験で調べた。HI 試験に用いた抗原ウイルスには、ワクチン製造株、その原株、および MDCK 細胞または孵化鶏卵分離の最近の流行株を用いた。

(倫理面への配慮)

ワクチン接種前後のヒト血清抗体の採取にあたっては、インフォームドコンセントをとり、倫理委員会の了承を得た。

4) (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ならびに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

ヒト末梢血細胞あるいは記憶 B 細胞と T 細胞を移入した NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスに不活化ワクチン（季節性として A/New Caledonia/20/99、新型として A/Narita/1/2009）を接種した。10 日後に、脾臓の摘出と採血を行い、脾臓中のヘマグルチニン（HA）に特異的な抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて、血清中に含まれる抗 HA 抗体価を ELISA 法にて測定した。

（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。

5) 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 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

12 種のきのこの熱性抽出物を用いた。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。

マウス免疫方法

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。

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 gracilentia* (5 μ g/ml), *Lentinula edodes* (5 μ g/ml) or *Grifola frondosa* (5 μ g/ml) を添加し 6 日目に TNF- α を ELISA 法で測定した。

ヒトへのワクチン接種

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 μ g HA/500 μ l 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。回収した鼻腔洗浄液の粗雑物の除去を行い、遠心濃縮チューブを用いて鼻腔洗浄液の濃縮を行った。

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。

6) 研究開始当初、ELISA 技術による、後半ではそれに加えて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識別特異性監視法を様々な条件で構築した。さらに、ウイルスの受容体である N 型シアロ糖鎖の精密構造解析技術の開発 (高速液体クロマトー質量分析系の開発) も行った。この技術を駆使して、ブタやニワトリなどの中間宿主呼吸器における N 型シアロ糖鎖の精密構造解析を実行した。さらに、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。7) 2005 年から 2007 年の間に、仙台および福岡から集められたインフルエンザ分離検体 223 件から抽出された 66 件について解析を行った。ウイルスは MDCK 細胞によって分離され、RNA 抽出後 RT-PCR を行い、塩基配列を同定した。系統樹は近隣接合法によって作成した。

2009 年 1 月 1 日以降、仙台市内の 5 つの開業小児科医療施設においてインフルエンザ迅速診断キット陽性であった患者より咽頭拭い液および鼻腔拭い液を採取し、ウイルス分離およびウイルス学的解析を行った。ウイルス分離は MDCK を使用し、同定は赤血球凝集阻止試験を行った。ウイルス学的解析として、HA1 領域 (抗原決定部位)、NA (オセルタミビル作用部位)、M (アマンタジン

作用部位) の塩基配列を同定した。また、抗インフルエンザ薬の投薬の有無、臨床データも同時に収集した。

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か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。まず、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。

2009 年 8 月 1 日から 12 月 31 日までに、仙台市内の 2 つの小児科外来施設において、インフルエンザ様症状を呈し迅速診断キット陽性であった患者より検体を採取し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。細胞変性効果が確認され、赤血球凝集試験陽性であった培養上清から RNA を抽出し、

complementary DNA を作成し、全 HA 遺伝子、NA 部分遺伝子を増幅し(NITE/NIID, 2009)、同部位の塩基配列を同定した。また、一部検体については、我々が考案したオセルタミビルの耐性遺伝子マーカーである H275Y を検出する Restriction Fragment Length Polymorphism (Nukiwa N, et al., 2010)) をもちいた耐性株のスクリーニングを行った。また、同 2 施設において、タミフルもしくはザナミビル服用後患者より分離された 10 株について、前述の方法でのスクリーニングおよび、Oseltamivir および Zanamivir に対する薬剤感受性試験(IC50 測定)を行った。

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。

8) (1)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、初診時、再診時にウイルス分離を行った。(2) ミャンマー、ベトナム、レバノン、ロシアの医療機関を受診したインフルエンザ様疾患患者から、ウイルス分離を行った。

(3) 2007 年から 2008 年にかけて国内で流行した馬インフルエンザ起因ウイルスである H3N8 亜型ウイルス 13 株を収集した。

(4) ウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列の決定、または NA 遺伝子の特定の変異部位をターゲットとしたサイクリングプローブ法 (H1N1-H274Y 変異) によりノイラミニダーゼ阻害剤変異を検出した。

(5) 各ウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害剤である Oseltamivir 活性体 (GS4071) および Zanamivir 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-acetyneuraminic 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。

(倫理面への配慮) 者からの検体採取や調査遂行にあたっては、検体採取を行うそれぞれの医療施設が所属する倫理委員会から調査の許可を得た。

9) 1. 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

電話相談は 2009 年より国立感染症研究所 (以下感染研) 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、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員を交代で配置し、バックアップ担当とするなどして協力体制を整えた。また、初年度には感染研、総務部に送られたインターネットによる相談にも対応したが、22年度には電話のみの相談に対応した。相談者にはアンケート調査の協力を得て、可能な限り年齢、職業、居住地（都道府県）を聴取した。

（倫理面への配慮）

倫理面の配慮として個人名は除いた。また、これらの個人情報外部に出ることはない。

2. 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）

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. 結果

(1) 鳥ウイルスに対するレセプターの分布、構造の詳細を、様々な動物種において解析し、イヌ、

ネコなどの多くの動物がH5N1鳥インフルエンザウイルスに対して感受性を持つことの、分子基盤を明らかにした。

[喜田 宏]

気管ぬぐい液および糞便11,819検体から250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H12までの12の亜型に、NA亜型はN1からN9までのすべての亜型に区分された。分離されたウイルスにはH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスも含まれていた。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に区別され、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。

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

から、Sw/北海道/81 (H1N1)株のPB2 遺伝子と Ck/山口/04 (H5N1)株の 7 分節を有する H5N1 遺伝子再集合ウイルスは、豚における増殖性を獲得することがわかった。

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するためにも、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。

今回調べた H5N1 ウイルスはこれまでに調べた 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と考えられる。また、豚に感染しない H5N1 ウイルスが豚インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合により増殖性を獲得したことから、鳥と豚由来の 2 つのウイルスが豚に同時感染することを防ぐ衛生対策が H5N1 ウイルスを豚に定着させないことに重要とわかった。今後、豚における増殖性に関与する分子メカニズムを宿主側の因子との相互関係も含め解明する予定である。
[河岡義裕]

NHBE 細胞での増殖性において、カモ由来株<ニワトリ由来株<ヒト由来株といった明確な傾向がみられた。ニワトリ由来株の中には、ヒト由来株と同程度の高い増殖性を示す株も存在し、一方、NHBE 細胞での増殖性が低い鳥由来株は、大半が継代途中で途絶えてしまったことから、過去に起きたヒトへの感染は、ニワトリ等に適応し、ヒトの細胞で増えやすくなったウイルスがヒトに感染していた可能性が示唆された。

一方、淘汰されずに NHBE 細胞での増殖性が上昇した鳥由来株では、主にポリメラーゼ遺伝子に変異が生じていた。NHBE 細胞での継代過程において、異なるクレードに属するヒト由来の 2 株に共

通して、宿主細胞のレセプターと結合するヘマグルチニン (HA) 遺伝子に同一の変異が起きていた。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。

次に、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ということが明らかになった。

本研究により、H5N1 ウイルスはヒト気管支上皮細胞で継代することで、様々な変異を獲得し、高い増殖性を示すようになることが明らかとなった。また、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。

さらに、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。

[田代真人]

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

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

一方、2009 年に出現した H1N1pdm ウイルスについて、米国 CDC が公表した遺伝子塩基配列から、病原性、流行規模、健康被害、抗ウイルス剤のコウイカ、ワクチンの必要性及び剤型の在り方、投与方法、効果などに関するリスク評価を行った。

この結果、今回のウイルスは北米のブタ H1N1 を基本とした複雑な遺伝子交雑体であり、高病原性鳥 H5N1 やスペインかぜインフルエンザウイルスで認められる病原性を規定するシグナルは全く存在しないことを推定し、新型ウイルスは典型的な弱毒型ウイルスであることを WHO および厚労省に報告した。

さらに、抗原的にはブタ型ウイルスとかなりの部分で共通することを示した。しかし、未だヒト型には変化しておらず、様々なブタ型ウイルスの性状（すなわちトリ型ウイルスのかなりの性状）を維持しているため、免疫を欠如している若年者などが感染した場合には、鳥インフルエンザが人に感染した場合と同様に、肺胞上皮にも感染して、肺炎を起こす可能性が考えられた。

さらに、新型 A(H1N1)pdm ウイルスと季節性 H1N1

ウイルスとの間の共通する抗原エпитープの解析および、高齢者を中心として多くの成人が交差免疫を持っていることから、流行規模や健康被害は軽微なものにとどまる可能性を指摘した。これらの所見などから、流行規模は従来の新型インフルエンザ程度にはなるが、大きな健康被害は起こらないこと、社会・経済的な影響も軽度であることが予測され、これらのリスク評価からは、不必要な強力な社会活動等への介入は必要ないことを具申した。

また、緊急対応としての新型ワクチンについても、1976 年のブタインフルエンザワクチン接種の臨床試験成績や、ウイルス遺伝子から推定される T 細胞抗原エпитープの共通性などから、適当なワクチン株の選択およびワクチン剤型の在り方を検討した。

その結果、新型 A(H1N1)pdm ウイルスと季節性 H1N1 ウイルスとの間の共通する抗原エпитープの存在および高齢者を中心として多くの成人が交差免疫を持っていることから、アジュバントを用いない季節性ワクチンと同じ剤型のワクチンで十分に免疫を誘導できることを予測した。さらに、多くの成人は新型ウイルスと交差する免疫記憶を持つことから、ワクチンの一回接種でも十分な免疫応答が期待できることを予測した。

一方、抗ウイルス剤については、遺伝子解析の結果から、アマンタジンには耐性を示すが、ノイラミニダーゼ阻害剤には感受性をもつことを予測した。これらの予測、リスク評価は、状況の変化に応じて再評価したが、その度に、厚労省および WHO にも報告した。さらに、これらの予測について、ウイルス学的に実証作業を進めた。その結果、ウイルス遺伝子の全塩基配列の解析に基づき、これまでの分子疫学、分子ウイルス学の研究成果に基づいたリスク評価を行った結果は、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た。一方、国内外の鳥、ブタにおけるインフルエンザを検討し、OIE, WHO と協力して国際監視体制の確立を進めた。

[小田切孝人]

(3) 流行中の鳥ならびに人ウイルスの全てを検出できる RT-PCR プライマーを設計・改良し、WHO 標準プライマーとして公表し、その後分離された多くの H5N1 ウイルスについて検出感度を検討した。また、簡易迅速診断キットとして LAMP 法を開発し、国内で市販された。また、H1N1pdm についても、同様のキットを開発し、市販された。

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

さらに 2005 年インドネシア分離株 (Clade2.1) 由来の備蓄用ワクチン (1 千万人分) の製造への応用に引き続き、2007 年には安徽株ワクチン (Clade2.3) の備蓄が行われた。さらに、2008 年度には青海株 (Clade2.2) の国家備蓄を行った。また、ベトナム株で免疫されたヒトの血清について、他のクレードのウイルスに対する中和抗体価を測定したところ、強い交差反応性が認められた。一方、2009 年の H1N1pdm ウイルスに対する RT-PCR プライマーおよびプローブの設計、改定を速やかに実施し、国内外における緊急検査体制の構築に貢献した。

2009 年の A/H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミック発生前に、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスを対象ではあったが、検疫所および地衛研に対して、トレーニングコースを開催し技術移転が完了していたために、パンデミック発生の際は、地衛研および検疫所に 1 週間で A/H1N1pdm09 ウイルスの検査体制を緊急配備することができた。これは、世界に類を見ない迅速な新型インフルエンザ対応の成功例となった。また、今回構築した検出系は、WHO の PCR-Working Group とも共

有し、国外の検査機関での診断検査系の開発にも役立てられた。また、海外からの検査依頼にも対応し、国際貢献ができた。

(5) 薬剤耐性インフルエンザウイルスの研究

流行ウイルスの薬剤感受性と遺伝子変異を調べた結果、現時点での耐性ウイルスは 1% 未満であったが、治療後に薬剤耐性が出現する可能性が示唆された。しかし、2007/08 シーズンでは、N275Y によってタミフル耐性となった H1N1 が日本にも侵入し、2008/2009 シーズンには H1N1 のほぼ 100% がタミフル耐性であることが明らかになった。この事実は、新型インフルエンザウイルスにおいても、薬剤耐性が出現する可能性を示唆しており、複数の抗ウイルス剤を備蓄して、リスク分散をしておく必要性を示している。

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調べた。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、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。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。

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。

耐性株の抗原性および遺伝子解析

07/08 及び 08/09 シーズンに国内で分離された耐性株は 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た。一方、耐性株の NA 遺伝子の系統樹上では、クレード 2B (アミノ酸マーカ: H45N、G249K、T287I、K329E、G354D) に分類され、海外から移入された可能性が示唆された。

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

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。

A/H1N1pdm09 ウイルス検出診断系の緊急構築と地衛研への緊急配備

2009 年 4 月 30 日の国内に A/H1N1pdm09 ウイルスが侵入する前に、米国 CDC から提供された遺伝子配列情報を元に設計した RT-PCR 法用のプライマー、リアルタイム RT-PCR 法用のプライマーとプローブ、そしてリアルタイム RT-PCR 法に必要な試薬を、全国の 75 カ所の地衛研および 15 カ所の検疫所に緊急配備した。また、A/H1N1pdm09 ウイルス診断マニュアル、検査フローチャート、検

体を感染研に送付する際に必要な検体情報入力フォーマットシートを作成し、5 月 1 日に感染症情報センターおよび厚生労働省食品安全部企画情報課検疫所業務管理室を通じて地衛研および検疫所に配布した。検査に必要な陽性コントロール(この時点でもまだカリフォルニア株の入手ができていなかったため北米系統のブタインフルエンザウイルス (H1N2) 株から抽出した RNA) も、同日インフルエンザウイルス研究センターから発送した。その後、米国 CDC から入手したカリフォルニア株で追検証し、今回構築した検出系の感度および特異性には問題なく、季節性の A/ソ連型 H1N1 ウイルスを明確に区別し、A/H1N1pdm09 ウイルスのみを特異的に検出できる検査系である事が確認した。

(7) ワクチン株の評価

5. A/H1N1pdm09 ウイルスによるワクチンの評価。

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。

A/H3N2 ウイルスによるワクチンの評価。

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。

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。

[西藤岳彦]

1.1 国内におけるインフルエンザ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様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遺伝子の塩基配列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。分離株について、NAIアッセイを行ってGS4071およびZanamivirに対する IC_{50} を求めたところ、H274Y変異を持つ3株は予想通り高い IC_{50} 値を示すことが明らかになった。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GS4071に対して高い IC_{50} 値を示した(Texas/36/91_V_40; 1.1 μ M, 07N020; 1.2 μ M, 07N035; 0.9 μ M, 07K030; 0.9 μ M)。一方これらのウイルスのZanamivirに対する IC_{50} 値には有意な変化は認められなかった。すなわち、2007/08年の北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎でのA/H1N1 0s耐性変異(H275Y)は0.4%と低かった。

1.2 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、Oseltamivir服用患者38例、Zanamivir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、Oseltamivir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Oseltamivirに対する IC_{50} は、584nMであったが、Zanamivirに対する IC_{50} の変化は認められなかった。

2.1 2007-2008年ミャンマーH3N2株解析

2007-2008年にミャンマー国内で採取されたインフルエンザH3N2株275件についてNA遺伝子のシーケンスを行ったところ、2件(0.7%)にNA遺伝子136位Gln→Lys変異がみられた。ノイラミニダーゼ阻害試験を行ったところ、ザナミビルに対してそれぞれ、 IC_{50} は59.7nM, 33.4nMであった(表2)。同時期に採取されたH3N2株に比して阻止濃度が30-60倍上昇しておりザナミビル耐性株であると考えられた。オセルタミビルに対して阻

止濃度上昇はなかった。

2.2 2008-09 年 国外における NAI 耐性株の頻度について

2008-09 年シーズンに、レバノン、ヴェトナム、ロシア（ウラジオストク）で採取された季節性インフルエンザ A/H1N1 (39 件), H3N2 (40 件), B 型株 (4 件) 合計 83 件についてノイラミニダーゼ阻害剤の耐性について調査した。H1N1 は全体で見ると、28 件 (71.8%) が NA 遺伝子の H274Y 変異をもつオセルタミビル耐性であった (表 3)。H274Y 変異 H1N1 株のオセルタミビルに対する IC₅₀ は 824.9 ± 261.7 nM であり、感受性株に比して約 400 倍の阻止濃度の上昇があった。ザナミビル耐性はみられなかった。また、H3N2, B 型にオセルタミビルやザナミビル耐性株はなかった。国別頻度では、レバノンは H1N1 の 100% (3/3 株)、ベトナムは 67.7% (4/6 株) が、ロシア（ウラジオストク）は 70.0% (21/30 株) がオセルタミビル耐性株であり、国別の頻度にばらつきがあった。

3.2 馬 II 型インフルエンザウイルスの NAI 感受性について

2007 年から 2008 年にかけて、国内で分離された馬 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、推定アミノ酸配列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 A/Equine/Miami/63 (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 NAI 耐性に関与するアミノ酸置換の有無を検索したが、NAI 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) を測定した。GS4071

に対する IC₅₀ は、07/08 発生株と Eq/Miami/1/63 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、ザナミビルに対する IC₅₀ は、Eq/Miami/1/63 が 4.3 nM であったのに対して、13 株の平均は 18.3 nM 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、1.1 nM であった。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、欧米での流行に比べ比較的 low レベルであったことが明らかにされた。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が示唆された。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。

2009 年、オーストラリアと米国 CDC グループから、それぞれ相次いでザナミビル耐性 H1N1 (Q136K 変異) が報告された。我々が見出した H3N2 亜型の耐性株は全く同じ NA の 136 位 Gln→Lys 変異を保持していた。オーストラリアと米国の H1N1 の Q136K 変異株は、両報告ともオリジナルの咽頭ぬぐい液からは、Wild type の Q136 のみが検出され、MDCK 細胞の培養後にはじめて K136 変異が検出され、培養により変異株が選択された可能性が示唆された。しかし、我々が見出した H3N2 株の K136 変異株は、MDCK 培養後と同様オリジナルの臨床検体中にも存在した。このため、今回認められた H3N2 亜型 Q136K 変異株は、培養によって選択された結果ではないということが示された。しかしながら、Q136K 変異株のザナミビルに対する阻止濃度は 30-60 倍の上昇であり、オセルタミビル耐性 H274Y 変異株の 400 倍に比べるとかなり低い。また、ザナミビルの用法は吸入のため、気道表面の濃度が非常に高くなることが予測される。このため、Q136K 変異株が、臨床的にも耐性を呈するのかが否かは不明である。