

Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zanbon, 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

1. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎：キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
2. 池野大介、来海和彦、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：BALB/cマウスを用いたパンデミックワクチン投与方法の検討 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
3. 氏家誠、小淵正次、影山努、白倉雅之、岸田典子、島袋梢、望月菊、堀川博司、加藤裕美子、山田隆一、藤田信之、田代真人、小田切孝人：2007/08シーズンに分離されたH275YマーカーをもつインフルエンザウイルスA/H1N1 オセルタミビル耐性株の国内発生状況 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
4. 川上千春、小淵正次、氏家誠、七種美和子、野口有三、小田切孝人、田代真人：横浜市におけるオセルタミビル耐性A/H1N1型インフルエンザウイルスの解析 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
5. 小淵正次、氏家誠、板村繁之、影山努、白倉雅之、原田勇一、岸田典子、堀川博司、加藤裕美子、細山哲、原田健史、矢代勲、山田隆一、藤田信之、小田切孝人、田代真人：2007/08シーズンのインフルエンザ流行株と平成20年度のワクチン株 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
6. 牧角啓一、来海和彦、深田勝彦、西村知裕、工藤康宏、後藤修郎、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：ワクチン製造用無血清培地浮遊培養 MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性および性状解析 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
7. 高橋宣聖、阿戸学、二宮愛、長谷川秀樹、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人、小林和夫：H5N1 (NIBRG-14) ワクチンの感染防御効果には、抗ヘマグルチニン抗体と抗ノイラミニダーゼ抗体の両者が関与する 第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月
8. 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人、多田善一、城野洋一郎、池田富夫、五反田亨：新型インフルエンザワクチンの効果判定の指標としての抗体価測定法 (HI 試験及び中和試験) の再現性と感度の比較 第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月
9. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典子、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討 第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月
10. 小淵正次、氏家誠、板村繁之、影山努、白倉雅之、原田勇一、岸田典子、小田切孝人、田代真人：今シーズンのインフルエンザ流行株の状況と来期のワクチン株について 衛生微生物技術協議会第29回研究会、東京、2008年6月
11. 松寄葉子、三條加奈子、須藤亜寿佳、青木洋子、水田克巳、氏家誠、小淵正次、小田切孝人、田代真人：山形県におけるオセルタミビル耐性H1N1インフルエンザウイルスの分離と一小学校での流行 第85回日本小児科学会山形地方会、山形、2008年12月
12. 田島かおる、松峯祥子、外崎郁美、三條加奈子、青木洋子、須藤亜寿佳、水田克巳、氏家誠、小淵正次、小田切孝人、田代真人、松寄葉子：オセルタミビル耐性A/H1N1ウイルスによると考えられた一小学校でのインフル

- エンザの流行 第35回山形県公衆衛生学会、山形、2009年3月
13. cladeの異なる風疹ウイルスに対する人血清中の中和活性の比較、大槻紀之、田代真人、駒瀬勝啓、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008年6月
 14. わが国における麻疹および風疹に対する抗体保有状況(2007年度感染症流行予測調査事業から)、佐藤弘、多屋馨子、駒瀬勝啓、田代真人、岡部信彦、第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本、2008年11月
 15. 關文緒、山田健太郎、染谷健二、駒瀬勝啓、田代真人：SSPEウイルスSI株のリバーシジェネティクス系の構築 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
 16. 加藤篤、清谷克寛、久保田耐、坂口剛政、吉田哲也、田代真人：インターフェロン α がセンドライウイルスの増殖に及ぼす影響 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
 17. 木所稔、齋加志津子、田代真人、加藤篤：リバーシジェネティクスによって作成したムンプスウイルスの病原性は原株の性状を反映しない、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月
 18. 木所稔、網康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、久保田耐、田代真人、岡部信彦、加藤篤：マーモセット感染モデルによるムンプスワクチン株の中枢神経病原性の評価、第12回日本ワクチン学会学術集会、熊本、2008年11月
 19. 久保田耐、松岡眞由美、張聡賢、田代真人、加藤篤、尾里啓子：IRF3/IRF7のウイルス感染依存的SUMO化修飾はインターフェロンの産生を負に制御する 第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月
 20. 白倉雅之、信澤枝里、田代真人：リバーシジェネティクス(RG)法による新型インフルエンザワクチン製造株の作成 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 21. 原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代真人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人：沈降H5N1インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 22. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人：新型インフルエンザH1N1のフェレットにおける病原性の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 23. 相内章、伊藤良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 24. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐紅、氏家誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人：季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 25. 影山努、中内美名、田代真人：新型インフルエンザウイルス(H1N1)核酸検出法の構築 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
 26. 小淵正次、氏家誠、岸田典子、徐紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、安樂茜、江島美穂、田代真人、小田切孝人：2008/09シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成21年度のワクチン株 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月

27. 氏家誠、島袋梢、安樂茜、江島美穂、小淵正次、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、田代真人、堀川博司、加藤裕美子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小田切孝人：2008/09 シーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y*)の国内発生状況 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月
28. 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の剤形と効果検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月
29. 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散(SRD)試験法の精度評価 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月
30. 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン力価測定に使用する標準抗原のHA含量決定に重要なHA含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月
31. 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修朗、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスを用いたH5N1株インフルエンザワクチンのプライム-ブースト効果の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月
32. 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代真人：沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1株)接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討 第13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月
33. 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13回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009年9月

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|---|
| 1. 特許取得 | 無 |
| 2. 実用新案登録 | 無 |
| 3. その他 | 無 |

Ⅱ. 分担研究報告書

平成20-22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

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。2008年から2010年の間に、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11,819検体から合計250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。また、これらのH5N1高病原性鳥インフルエンザ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。さらに、2004年に分離されたA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)は豚に感染しないが、豚インフルエンザウイルスA/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1)のPB2遺伝子とA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)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。以上より、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。

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。

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。

C. 研究結果

家禽と野鳥の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。

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性を獲得していた。本成績を確認するため、リバーシ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。

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。

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。

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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) Simulundu E, Mweene AS, Tomabechei D, Hang'ombe BM, Ishii A, Suzuki Y, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Ito K, Kida H, Saiwana L and Takada A. (2009) Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154, 1517-1522.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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 Oasl, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
- (16) 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.
- (17) 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* 27, 7402-7408.
- (18) 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 PA, 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 swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
- (19) Soda K, Sakoda Y, Isoda N, Kajihara M, Haraguchi Y, Shibuya H, Yoshida H, Sasaki T, Sakamoto R, Saijo K, Hagiwara J and Kida H. (2008) Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn J Vet Res* 55, 93-98.
- (20) Soda K, Ozaki H, Sakoda Y, Isoda N, Haraguchi Y, Sakabe S, Kuboki N, Kishida N, Takada A and Kida H. (2008) Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch Virol* 153, 2041-2048.
- (21) Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y, Takeuchi Y, Kida H and Ogasawara K. (2008) Induction of cytotoxic

- T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of a pathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124, 155-165.
- (22) Sakabe S, Sakoda Y, Haraguchi Y, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Saijo K, Sawata A, Kume K, Hagiwara J, Tsuchiya K, Lin Z, Sakamoto R, Imamura T, Sasaki T, Kokumai N, Kawaoka Y and Kida H. (2008) A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26, 2127-2134.
- (23) Okamoto M, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N and Kida H. (2008) Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol* 153, 2189-2195.
- (24) Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H., Takada A, Nidom CA, Mai le Q, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y and Horimoto T. (2008) Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26, 6398-6404.
- (25) Manzoor R, Sakoda Y, Sakabe S, Mochizuki T, Namba Y, Tsuda Y and Kida H. (2008) Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci* 70, 557-562.
- (26) Manzoor R, Sakoda Y, Mweene A, Tsuda Y, Kishida N, Bai GR, Kameyama K, Isoda N, Soda K, Naito M and Kida H. (2008) Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes* 37, 144-152.
- (27) Kishida N, Sakoda Y, Shiromoto M, Bai GR, Isoda N, Takada A, Laver G and Kida H. (2008) H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37, 16-21.
- (28) Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K and Kida H. (2008) A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.
- (29) Ito M, Nagai M, Hayakawa Y, Komae H, Murakami N, Yotsuya S, Asakura S, Sakoda Y and Kida H. (2008) Genetic Analyses of an H3N8 Influenza Virus Isolate, Causative Strain of the Outbreak of Equine Influenza at the Kanazawa Racecourse in Japan in 2007. *J Vet Med Sci* 70, 899-906.
- (30) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Soda K, Sakabe S, Sakamoto R, Imamura T, Sakaguchi M, Sasaki T, Kokumai N, Ohgitani T, Saijo K, Sawata A, Hagiwara J, Lin Z and Kida H. (2008) Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch Virol* 153, 1685-1692.
- (31) Igarashi M, Ito K, Kida H and Takada A. (2008) Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology* 376, 323-329.

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. Okamatsu, 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. Okamatsu, 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. Okamatsu, 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/24/2009 (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 (2010年、東京)
- (13) 「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)
- (14) 「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)
- (15) 「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)
- (16) 「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)
- (17) 「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)

- (18) 「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）
- (19) 「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43回日本ウイルス学会北海道支部会シンポジウム（2009年、帯広）
- (20) 「2008年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡松正敏、迫田義博、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会（2008年、岡山）
- (21) 「インフルエンザウイルスのカモに対する病原性の分子基盤の解析」梶原将大、曾田公輔、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会（2008年、岡山）
- (22) 「鳥インフルエンザウイルスの病原性獲得メカニズムの解析」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会（2008年、岡山）
- (23) 「高病原性鳥インフルエンザウイルス Ck/Yamaguchi/7/04 (H5N1) のブタにおける増殖能獲得の分子基盤」迫田義博、Rashid Manzoor、野村直樹、津田祥美、岡松正敏、尾崎弘一、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会（2008年、岡山）
- (24) 「2008年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡松正敏、迫田義博、吉田裕美、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第146回日本獣医学会学術集会（2008年、宮崎）

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

研究要旨:近年、ヒトから分離される H5N1 インフルエンザウイルスには、ヒトでの増殖過程で獲得したと考えられる変異が多数見受けられる。しかしながら、ヒトの間での流行が起きていないのは、感染・増殖する部位が肺の深部であり、上部気道で効率よく増えていないためと考えられる（ヒトで効率よく伝播するためには、くしゃみや咳で拡散されるために、比較的低温である上部気道で増殖する必要がある）。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、ヒトで効率よく伝播するように変化するかを調べるために、ヒトから分離された 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。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を調べるために、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。また、こ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。どのような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。

一方、哺乳動物で効率よ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よ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

H5N1 インフルエンザウイルスのヒトへの感染例は現在も増加している。幸いヒトの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。そのため、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。

また、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ことと考えられている。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

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、リバーズジェネティクス法（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

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ことが明らかになった。

D. 考察

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。

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や、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

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.

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.

Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26:562-572, 2008.

Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: the use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 82:2486-2492, 2008.

Iwatsuki-Horimoto K, Hatta Y, Hatta M, Muramoto Y, Chen H, Kawaoka Y, Horimoto T. Limited compatibility between the RNA polymerase components of influenza virus type A and B. *Virus Res* 135:161-165, 2008.

Sakabe S, Sakoda Y, Haraguchi Y, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Saijo K, Sawata A, Kume K, Hagiwara J, Tuchiya K, Lin Z, Sakamoto R, Imamura T, Sasaki T, Kokumai N, Kawaoka Y, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26:2127-2134, 2008.

Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y, Takeuchi Y, Kida H, Ogasawara K. Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of a pathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124:155-165, 2008.

Marsolais D, Hahm B, Edelmann KH, Walsh KB, Guerrero M, Hatta Y, Kawaoka Y, Roberts E, Oldstone MB, Rosen H. Local not systemic modulation of dendritic cell S1P receptors in lung blunts virus-specific immune responses to influenza. *Mol Pharmacol.* 74:896-903, 2008.

Sugaya N, Tamura D, Yamazaki M, Ichikawa M, Kawakami C, Kawaoka Y, Mitamura K. Comparison of the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir against influenza virus infection in children. *Clin Infect Dis.* 47:339-345, 2008.

Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454:890-893, 2008.

Murakami S, Horimoto T, Mai LQ, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol.* 82:10502-10509, 2008.

Jia B, Shi J, Li Y, Shinya K, Muramoto Y, Zeng X, Tian G, Kawaoka Y, Chen H. Pathogenicity of Chinese H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in pigeons. *Arch Virol* 153:1821-1826, 2008.

Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto

K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Midon CA, Mai LQ, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26:6398-6404, 2008.

Li C, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* 82:11880-11888, 2008.

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.

山田晋弥、伊藤睦美、坂井(田川)優子、高野量、堀本泰介、鈴木隆、鈴木康夫、河岡義裕「H5N1 インフルエンザウイルスの正常ヒト呼吸器上皮細胞における増殖性に関する変異」第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月28日

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 20-22 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）で開設、継続した。これまでに 1816 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 212 件であった。相談の内容は新型インフルエンザが出現した 平成 21 年度は新型インフルエンザ、季節性インフルエンザ、鳥インフルエンザの相談 が多く寄せられた。平成 22 年度ではメディア報道を受けての相談が多く全感染症に及んだ。相談者の職業をみると企業、主婦、医療機関、行政機関、教育機関が主であった。相談者の年齢は 30 代、40 代、50 代が大半を占めた。性別では男女ほぼ半々であった。相談者の居住地別をみると関東、近畿地方が多く、相談が寄せられなかった県は 2~4 県であった。

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
萩原敏且 同上
松本美弥子 同上
小船富美夫 同上
中山幹男 同上
鈴木一義 同上

民への情報伝達と正しい知識 の普及が重要という観点から電話相談窓口を設けた。感染研においても問い合わせが来るため、相談窓口を設置し、医療機関、行政機関（学校を含む）に対応した。インフルエンザ以外にも専門性の高い相談に 対応することも予想されたので必要に応じ感染研の各専門部への連絡を行うこととしたが、一時スクリーニング的な機能を持たせ、各専門部における一般的な質問に対応する負担を避けることを目的とした。

A. 研究目的

2009 年 4 月にアメリカ、メキシコでブタ由来インフルエンザウイルスによる人 への感染が発生し全世界に波及した（パンデミックインフルエンザ 2009）。WHO はこれを新型インフルエンザとし、同年 5 月 11 日にパンデミック、フェーズ 6 を宣言した。わが国では 5 月中旬に一時的流行があり、封じ込め対策が取られ一時収まるかのように見えたが再び増加、9 月に全国的な流行に入った。厚生労働省は新型インフルエンザ対策として国

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

3年間の電話相談は総計1816件であり新型インフルエンザの相談は212件であった。新型インフルエンザのニュースが新聞などをにぎわしたところが相談のピークがあり、新型インフルエンザに対する相談が増加した。2010年以降も新興・再興感染症についても報道に影響を受けていることから報道と相談内容の関連性を解析した。その結果相談の多かった上位2位は全てメディアとの関連性が認められた（平成22年度報告書、図1参照）。

D. E. 考察と結論

感染症についての本相談窓口は医療機関、行政機関、教育機関という限られた範囲であり感染研への電話ということから、相談件数はそれほど多くないが質問は多岐であった。その回答に当たっては幅広い知識が要求されたが相談担当者の正確な最新情報収集と専門部の協力により順調に運営された。今後も感染研・情報センターおよび研究部との連携でさらに発展し国民の期待にこたえることが望ましいと思われる。

ただし、感染研が一般への対応までもすべて行うということになれば質問数の増加は以前の経験より明らかであり、現状の人数・体制では早急に破たんすることになり、むしろ期待感から不満感に変化する可能性がある。今後感染研としてどの程度までの電話相談に応じるのかは課題として残された。

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

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。

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

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

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みると、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

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

平成20-22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

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 HI 試験や中和試験に基づいたインフルエンザワクチン有効性の評価は、様々な問題点が指摘されており、生体内での免疫応答をより反映した評価法の導入が望まれている。本研究では、インフルエンザワクチンに対するヒト液性免疫応答を再現するヒト化マウスのシステムを構築した。この実験システムを用いる事により、季節性 H1N1 ワクチンに対する抗 HA 抗体産生応答が再現されることを確認した。さらに、新型インフルエンザ H1N1pdm ワクチンの接種により、血清学的にナイーブな健常人でも H1N1pdm に対する中和抗体が効率的に誘導される現象が観察されているが、この交差免疫記憶の原因機構を探るため、本実験システムを利用した。その結果、H1N1pdm ワクチンが惹起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

ヒト末梢血由来リンパ球を移入した免疫系ヒト化マウスを用い、インフルエンザワクチンが誘導する免疫記憶応答を解析し、ワクチン有効性の評価に利用する。

B. 研究方法

(1) ヒト血清ならびに末梢血細胞の調製
季節性インフルエンザワクチン接種前のボラン

ティア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⁺