

(3)近年、日本で分離された NVF1 株を人工培地にて長期継代したところ、20 代の継代にて性状が変化することが明らかになった。これより保有株の弱毒化の原因の 1 つは人工培地による長期継代によるものと考えられた。このため分離および継代方法が明白な NVF1 株は野兎病菌日本分離株の標準となり得ると示唆され、NVF1 株の病原性について詳細を解析する必要がある。

(4)ラットは日本分離野兎病株の皮内接種に対しても抵抗性であることが明らかになった。マウスとの感受性相異はラットが末梢における免疫応答がマウスと比較し強いためである可能性が示唆された。また腹腔内接種にてラットの F344/N と SD 系統の間で感受性が異なることが示唆されたため、今後系統間における免疫応答の比較解析は野兎病菌感受性相異のメカニズム解析において興味深い。

・ 研究分担者(なし)

IV. 今後考えられる新たな課題

(1)日本国内に保有される野兎病菌 Type A (強毒株) は全て弱毒化されていると考えられた。今後の野兎病菌研究の進展およびバイオテロ対策のため、野兎病菌 Type A 株を海外の研究者から分与してもらう必要がある。野兎病菌は 2 種病原体であり移動が非常に困難なため、政府の援助が必要となるだろう。

(2)直接的に海外由来株と日本分離株の病原性比較は不可であったが、既報の海外由来株の病原性解析を参照すると、日本分離株は海外の野兎病菌 Type B 株と同様の病原性を有すと考えられた。このため日本国内においても海外と同様に、大規模な集団発生が起る可能性を否定できなかった。

(3)日本分離株においてもマウスは高感受性、ラットは抵抗性であることが示されたため、今後の野生動物における野兎病血清抗体調査にはラットなどの抵抗性動物種のサンプルが有用と考えられた。

(4)多くの保有株の病原性を主とする性状が既報の一般性状と異なった原因の 1 つとして人工培地における長期継代が考えられた。NVF1 株は分離源である感染ノウサギの脾臓が残存し、継代歴が明白であるため、日本分離野兎病菌の標準株として推奨可能と思われる。本研究課題において明らかになった基礎データを報告し、日本分離野兎病菌の標準株としての土台を固めたい。

(5)野兎病菌に対する感受性相異の解明はラット系統間の免疫応答の相異の解析が有効と考えられたため、各系統ラットに菌接種後、経時的に接種部位の菌量やサイトカイン、白血球動態などの解析が興味深い。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1)厚生労働省の検討会において新興・再興感染症対策のための資料となることが期待される。

- (2)野兎病菌を用いたバイオテロやアグリテロ対策の資料となることが期待される。
- (3)野兎病のような野生動物が感染源となる感染症のサーベイランスに関する資料となり得る。
- (4)国内における野兎病発生時の対応における基礎資料となる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

・研究代表者 堀田明豊

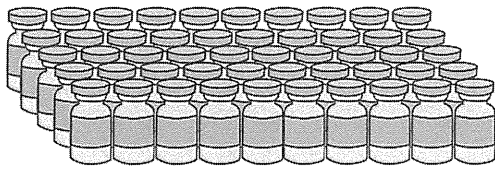
1. *In vitro* Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. ○
Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Morikawa S, Tanabayashi K.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 投稿中

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

保有野兎病菌51株(日本、海外)

(近年日本分離のKU-1およびNVF1の2株を含む。他49株の継代歴は不明)



株間の性状比較



正常



異常

遺伝子解析 細胞内増殖性 マウス病原性 etc.

- ・保有株は遺伝子学的に6つのグループに分類可能
- ・日本分離株の薬剤感受性は株間で多様(論文)
- ・他の性状において日本分離と海外由来株の相異は認めず。
- ・細胞内増殖性株はマウス病原性あり
- ・マウスは病原株接種後14日以内に斃死

4株(KU-1およびNVF1の2株を含む国内分離株)



野兎病菌の病原性解析に有効

NVF1株は継代歴が明らか
なため日本分離野兎病菌の
標準株として推奨可



NVF1株のラット病原性解析

- ・マウスと比較し、野兎病菌抵抗性
- ・皮内接種では無症状、高い抗体価認める
- ・腹腔内接種では体重減少など症状あり
- ・ラット系統間で感受性に相異あり

- ・ラットでは末梢の免疫応答がマウスに比較して強い可能性
- ・系統間の免疫応答の比較解析は感受性相異のメカニズムが解明に有効

47株(海外由来全17株を含む)



- ・3株が遺伝子学的に弱毒化
- ・39株が細胞内増殖性認めず
- ・5株がマウス病原性認めず

一般的な野兎病菌として
病原性研究に使用不可

相異の原因は？

NVF1を人工培地で継代し、性状変化を確認。

継代の回数や方法が原因の1つである可能性

・日本と海外の野兎病菌の病原性比較解析は困難
・海外からの野兎病菌分与が必要

●研究代表者の研究歴等

※ 研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

2008年4月 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官に着任

2003年10月 国立感染症研究所 獣医科学部第3室研究員に着任

野兎病菌に対するモノクローナル抗体の作出、国内生息野生動物における野兎病血清疫学調査、トリインフルエンザウイルスの検出・分離など

2003年4月 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 リサーチレジデント

国立感染症研究所獣医科学部に流動研究員として赴任

野兎病の診断方法、菌分離、菌体検出および血清抗体価測定方法に関する研究

2003年3月 岐阜大学大学院連合獣医研究科博士課程を修了 学位授与

学位論文題目「*Coxiella burnetii*の抗原性に関する研究」

論文本数 主著7 共著17 取得特許1

・過去に所属した研究機関の履歴

岐阜大学獣医学科家畜微生物学講座

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平井克哉(岐阜大学 名誉教授)

福士秀人(岐阜大学 教授)

山口剛士(鳥取大学 教授)

山田章雄(東京大学 教授)

棚林清(国立感染症研究所 獣医科学部第3室室長)

森川茂(国立感染症研究所 獣医科学部部長)

・主な研究課題

「野兎病を主とした動物由来感染症に関する研究」

「国内生息野生動物における野兎病の血清疫学調査」

「高病原性鳥インフルエンザに関する研究」

「Q熱起因菌 *Coxiella burnetii* の抗原性に関する研究」

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※ 発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1 *In vitro* Antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. ○

- Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Morikawa S, Tanabayashi K. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 投稿中
2. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Sharma N, ○Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Tanabayashi K. Clinical Vaccine Immunology. 2012 Oct 31. 印刷中
 3. Altered specificity of single-chain antibody fragments bound to pandemic H1N1-2009 influenza virus after conversion of the phage-bound to the soluble form. Kaku Y, Noguchi A, Okutani A, Inoue S, Tanabayashi K, Yamamoto Y, ○Hotta A, Suzuki M, Sugiura N, Yamada A. BMC Research Notes. 2012 Sep 4;5:483. 10.1186/1756-0500-5-483.
 4. Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. ○Hotta A, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Mizoguchi T, Yamada A. Zoonoses and Public Health. 59: p82-95, 2012.
 5. トウホクノウサギ (*Lepus brachyurus angustidens*) の症例-野生動物の病理解剖の意義と感染リスク-. 朴天鎬、中西中、畑井仁、小山田敏文、佐藤久聡、進藤順治、藤田修、○堀田明豊、井上智、棚林清 獣医畜産新報. 63:p197-200, 2010
 6. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, Tersteeg C, Masegi T, ○Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, McMurray DN, Samuel JE. Infection and Immunity. 77: p5640-5650, 2009.
 7. Pathological and Microbiological Studies of Japanese Hare (*Lepus Brachyurus Angustidens*) Naturally Infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Park G-H, Nakanishi A, Hatai H, Kojima D, Oyamada T, Sato H, Kudo N, Shindo J, Fujita O, ○Hotta A, Inoue S, and Tanabayashi K, The Journal of Veterinary Medical Science. 71: p1629-1635, 2009.
 8. Survival of Avian H5N1 Influenza A Viruses in *Calliphora nigribarbis* (Diptera: Calliphoridae). Sawabe K, Tanabayashi K, ○Hotta A, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Yamada A, Kurahashi H, Shudo C, Kobayashi M. Journal of Medical Entomology. 46: p852-855, 2009.
 9. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Fujita O, Uda A, ○Hotta A, Okutani A, Inoue S, Tanabayashi K, Yamada A, Microbiology and Immunology. 52: p270-276, 2008
 10. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, ○Hotta A, Yamamoto Y, and Yamada A., Japanese Journal of Infectious Diseases. 60: p355-361, 2007.
 11. Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. ○Hotta A, Uda A, Fujita O, Tanabayashi K, Yamada A, Clinical Vaccine Immunology. 14: p81-84, 2007.
 12. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow

- flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, Kurahashi H, Tanabayashi K, ○Hotta A, Saito T, Yamada A, Kobayashi M. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75: p327-332, 2006
13. 野兔病. ○堀田明豊、棚林清, 獣医畜産新報 (2006) No. 8: p644-648
 14. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, ○Hotta A, Terao K, Yamada A., Immunogenetics (2005) No. 57:p189-197
 15. Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens. ○Hotta A, Zhang G Q, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, The Journal of Veterinary Medical Science. 60: p1289-1291, 2004.
 16. SCID mouse model for lethal Q fever. Andoh M, Hotta A, Zhang G Q, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, Infection and Immunity. 71: p4717-4723, 2003
 17. Use of monoclonal antibodies to lipopolysaccharide for antigenic analysis of *Coxiella burnetii*. ○Hotta A Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Amano K and Hirai H, Journal of Clinical Microbiology. 41: p1747-1749, 2003
 18. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. ○Hotta A Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K, Infection and Immunity. 70: p4747-4749, 2002.
 19. Evaluation of a recombinant 27-kDa outer membrane protein of *Coxiella burnetii* as an immunodiagnostic reagent Zhang GQ, ○Hotta A, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. Microbiology and Immunology. 42:p423-428. 1998
 20. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. Zhang GQ, ○Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. Journal of Clinical Microbiology. 36: p2210-2213. 1998
 21. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. To H, ○Hotta A, Zhang GQ, Nguyen SV, Ogawa M, Yamaguchi T, Fukushi H, Amano K, Hirai K. Microbiology and Immunology. 42: p81-85, 1998
 22. Antigenic characteristic of the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. To H, ○Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. J Vet Med Sci. 60:p267-270. 1998
 23. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. Zhang GQ, Nguyen SV, To H, Ogawa M, ○Hotta A, Yamaguchi T, Kim HJ, Fukushi H, Hirai K. Journal of Clinical Microbiology. 36:p77-80. 1998

特許権

1. 簡便かつ迅速で安全な Q 熱診断方法および診断薬 特許第 4614313 号 (特願 2004-184260、出願 2004. 6. 22、登録 2010. 10. 29) 平井克哉、福士秀人、山口剛士、長縄崇、○堀田明豊、小宮智義、荒井節夫

・平成25年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。

無し

平成24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研究発表会

野兔病菌亜種間の病原性相異
 および
 動物種間の野兔病感受性の相異
 に関する研究

H23-24年度

国立感染症研究所 獣医科学部
 主任研究官 堀田明豊

野兔病

- 動物由来感染症、ノウサギが主な感染源
- 大原八郎医師により報告された急性熱性疾患

野兔病菌 (*Francisella tularensis*)

- 感染性が高い、バイオテロへ使用が危惧される指定病原体
- 菌の移動、取扱いが制限されている。国内に研究者いない。
- 日本分離株は海外由来株と遺伝子グループが異なる。



Francisella tularensis Type B の分布 ○ biovar I ● biovar I & II ◼ biovar japonica

目的

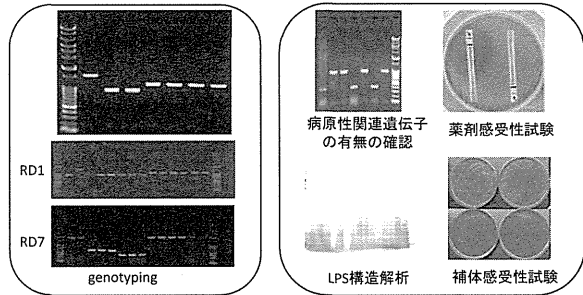
- 野兔病菌亜種間の病原性相異メカニズムの解明
 新規分離のNVF1株と共に保有野兔病菌50株の性状解析
- 動物種間の野兔病感受性相異メカニズムの解明
 マウス(高感受性)およびラット(低感受性)における病態および免疫応答の解析

- 国内と海外の野兔病菌の性状相異に関する基礎データの構築
- 野兔病サーベイランスに有効な動物種の推定



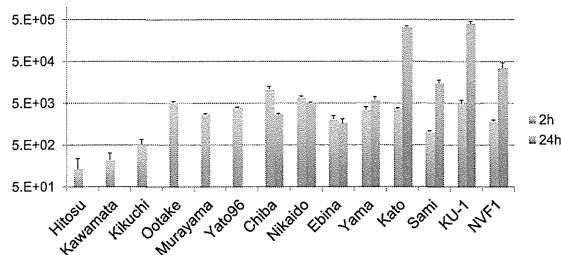
バイオテロ、迷入動物等による海外の野兔病菌の国内侵入時対策動物における野兔病菌分布状況の調査

保有野兔病菌51株の生化学的性状



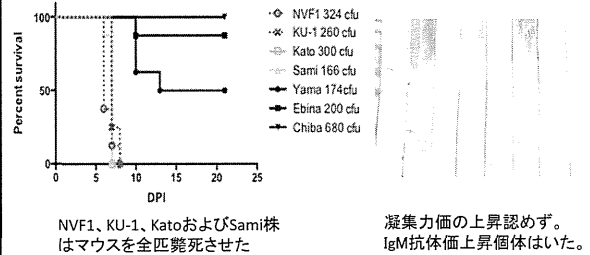
- 遺伝子性状から6グループに分けられた。
- 生化学的、免疫学的性状などより計6株は変異株と考えられた。

細胞内増殖性



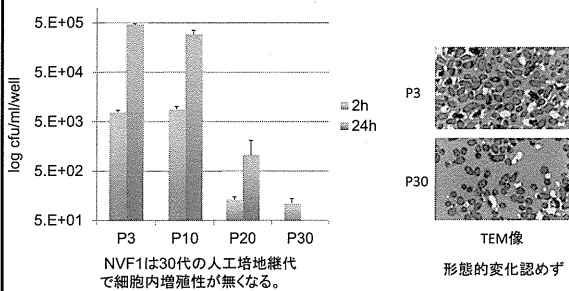
- 保有株は細胞内増殖性から3グループに分けられた。
- その増殖性は細胞種(マウスとラット由来)間で異ならなかった。

マウスに対する病原性



- 日本分離4株のみが標準的な病原性を示した。
- 細胞内増殖性を欠いた株はマウス病原性が認められなかった。
- 生残個体に抗体価の著しい上昇は認められなかった。

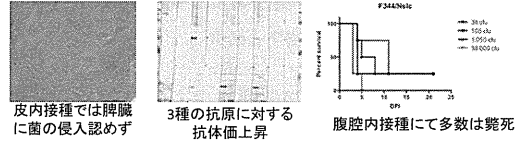
人工培地で継代した野兎病菌の性状変化



多数の保有株の生物学的性状が異常であった原因の1つとして、人工培地における連続継代の影響が考えられた。

ラットに対する病原性

- 10³cfu皮内接種にてF344、LEW、SDおよびWistarの4系統はいずれも無症状
- 接種21日後の凝集価は多数の個体で上昇
- IgMはLPS、IgGはLPS、17および42kDa蛋白抗原に反応
- 腹腔内接種においては多数が斃死したが生残個体も認められた。



- ラットは自然感染で斃死する可能性は低い。
- ラットはマウスと比較して野兎病菌に対し抗体産生が強い。

研究成果

- 保有株のうち日本分離4株以外の47株が変異していると考えられた。現状では海外由来野兎病菌の病原性研究は困難であり、日本分離株との病原性比較はできなかった。
- 野兎病菌の感染においてラットとマウスの感受性相異の要因の1つとして、抗体価の上昇が関与すると考えられた。今後、接種部位における菌と宿主細胞の動態を経時的に解析したい。

結論

- 国内における野兎病研究の進展、バイオテロ対策のためには、病原性が強い海外の野兎病菌株の取得、移動が急務である。今後、海外の研究者や政府などとの連携が必要と思われる。
- ラット類はマウス類と比較し、抗体産生が強く、血清疫学調査の対象動物として有用と考えられた。動物種間の免疫応答の相異についてさらに詳細を解析する必要がある。

平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題： 新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及びワクチン
使用戦略に関する研究

課題番号： H22-新興-指定-019

予定期間： H22年度から H24年度まで

研究代表者： 板村繁之

所属研究機関： 国立感染症研究所

所属部局： インフルエンザウイルス研究センター

職名： 室長

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 7,215,000 円 2年目 5,750,000 円 3年目 5,175,000 円 計 18,140,000 円

I. 研究の意義

- (1) インフルエンザワクチン製造において生産性の高いワクチン製造株の開発は必須である。
- (2) パンデミック出現時にワクチンの剤型選択に必要な基礎的な知見が不足している。
- (3) アジュバント添加ワクチンなどの新規ワクチンの品質管理手法が確立していない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ワクチンの生産性に与える遺伝的因子の解析と高生産性のワクチン製造株の開発。新型インフルエンザ出現時に、ワクチン接種が必要な人の需要に迅速に対応できることが期待される。
- (2) ワクチンの剤型の違いによる免疫応答を解析し、ウイルス株の亜型による適切なワクチン剤型の選択ができるようにする。
- (3) アジュバント添加ワクチンなどの新規ワクチンの品質管理手法を確立する。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

ワクチン製造株の開発から、ワクチンの品質管理、ワクチン剤型の使用選択にわたる研究テーマを結びつけ、各研究分担者が問題意識を共有して研究に当たれるようにした。

・研究分担者(白倉雅之)

- (1) ワクチン製造株について比較を行い、ウイルスとしての感染価は通常のワクチン製造株と同程度に高いが、ワクチンの有効成分であるヘマグルチニン (HA) 蛋白の産生量が低いウイルス製造株があることを見出した。
- (2) 低生産性の原因となる遺伝子変異を同定するために、遺伝子改変を導入したウイルス株を複製して HA 蛋白の生産性について調べ、ウイルス遺伝子の非コード領域、HA 蛋白のコード領域のシグナルペプチド、膜貫通領域、細胞内領域がワクチンの生産性に影響を与えることを明らかにした。

・ 研究分担者(佐藤佳代子)

- (1) 全粒子ワクチンとスプリットワクチンの異なる剤型で誘導される抗体応答を解析して量的、質的な違いを明らかにした。
- (2) 剤型の異なるワクチンでは抗原提示細胞内への抗原の取り込み、加工について違いがあることを見出した。

・ 研究分担者(横田恭子)

- (1) パンデミック出現時にワクチンの品質管理としての力価試験法を迅速に確立するために、H5亜型特異的なモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法による新規力価試験法を開発した。
- (2) 新規の力価試験法で測定したワクチンの力価は、現行の力価試験法である一元放射免疫拡散試験法とほぼ一致する成績であり、その有用性が示された。

・ 研究分担者(嶋崎典子)

- (1) アジュバント添加ワクチンの力価を測定するために、ワクチン有効成分のアジュバントからの分離方法について検討し、油系エマルジョンアジュバントからの超遠心処理による分離に成功した。
- (2) ワクチン製造株の HA 蛋白のアミノ酸変異が、ワクチンの有効性に関する抗原性の保持だけでなく、安定性にも影響を与える場合があることを見出した。ワクチンの品質管理としてワクチン製造株の変異を管理することは、ワクチンの有効性、安定性に重要であることが示唆された。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) どのような流行ウイルスであっても高生産性のワクチン製造株の開発に応用可能であるのか検証する必要がある。
- (2) 剤型の異なるワクチンによって誘導される抗体応答の違いが、どのような機構によるのか解明する必要がある。
- (3) 新規に開発した力価試験法が、免疫原性を反映した力価を測定できているのか検証する必要がある。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) ワクチン製造の生産性向上によるワクチン提供の迅速化
- (2) パンデミックワクチンの剤型選択についての指針の提供
- (3) パンデミックワクチンの品質管理試験の迅速な実施

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(研究代表者)

(1) Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. Jpn. J. Infect. Dis., 65: 19-27 (2012)

(2) Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiro Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 418: 38-43 (2012)

(3) Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S Robertson, Philip D Minor, Galina M Vodeiko, Jerry P Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, and Othmar G Engelhardt. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. Biologicals 40: 96-99 (2012)

(分担研究者)

横田恭子

(1) Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. Jpn. J. Infect. Dis., 65: 19-27 (2012)

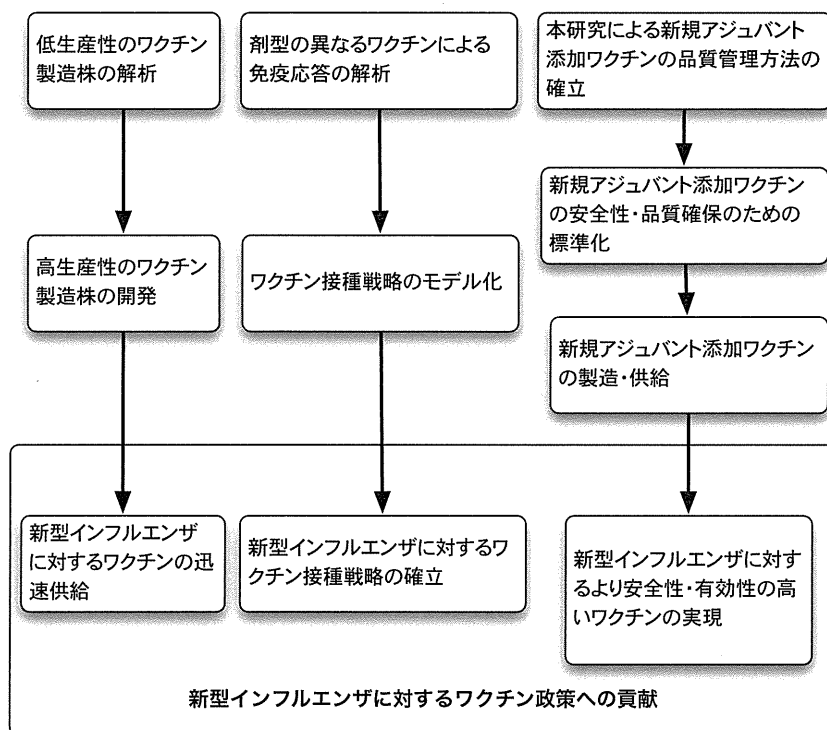
特許権等知的財産権の取得及び申請状況

H5亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体

特願2011-227748

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及びワクチン使用戦略に関する研究



● 研究代表者の研究歴等

・ 過去に所属した研究機関の履歴

昭和58年—昭和61年 京都大学ウイルス研究所

昭和62年より 国立予防衛生研究所（平成9年より国立感染症研究所に改称）

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

京都大学ウイルス研究所：畑中正一、小林信之、重定勝哉、今井六雄、志田壽利

国立予防衛生研究所：根路銘国昭、大谷明

北里研究所：森川裕子

マウントシナイ医科大学：Peter Palese

北海道大学：喜田宏

国立感染症研究所：西村秀一、岩崎琢也、小田切孝人、森川茂、長谷川秀樹、横田恭子、
田代真人

・ 主な研究課題

- 1) 遺伝子工学的に生産したヒトT細胞白血病ウイルス1型のウイルス蛋白を利用した血清学的診断方法に関する研究
- 2) ワクチニアウイルスベクターを用いた組換えインフルエンザワクチンの開発
- 3) インフルエンザウイルスの病原性、増殖制御機構に関する研究
- 4) SARS の血清学的診断法の開発
- 5) 新型インフルエンザに対するワクチン開発
- 6) 鳥インフルエンザの人への感染疫学研究
- 7) 新型インフルエンザワクチンの力価試験法に関する研究

・ これまでの研究実績

*Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65: 19-27 (2012)*

*Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura Katsuhiro Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418: 38-43 (2012)*

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S Robertson, Philip D Minor, Galina M Vodeiko,

Jerry P Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, and Othmar G Engelhardt. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. Biologicals 40: 96–99 (2012)

Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, and Kino Y. : Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. Vaccine 29, 4156-4161 (2011)

Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K. Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol Immunol 54: 81-88 (2010)

Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. Vaccine 27: 3121-3125 (2009)

Ogata, T, Yamazaki, Y, Okabe, N, Nakamura, Y, Tashiro, M, Nagata, N, Itamura, S, Yasui, Y, Nakashima, K, Doi, M, Izumi, Y, Fujieda, T, Yamato, S, Kawada, Y. Human H5N2 avian influenza infection in Japan and the factors associated with high H5N2-neutralizing antibody titer. J Epidemiol, 18:160-166 (2008)

Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Shigeyuki Itamura, Takehiko Saito, Yasushi Ami, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata. Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. Int. J. Exp. Path. 88: 403-414 (2007)

Takeshi Ichinohe, Shin-ichi Tamura, Ai Ninomiya, Masaki Imai, Shigeyuki Itamura, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hidehiro Takahashi, Hirofumi Sawa, Joe Chiba, Takeshi Kurata, Tetsutaro Sata, and Hideki Hasegawa. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection afforded by intranasal administration of seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. J. Infect. Dis. 196: 1313-1320 (2007)

Ichinohe, T, Kawaguchi, A, Tamura, SI, Takahashi, H, Sawa, H, Ninomiya, A, Imai, M, Itamura, S Odagiri, T, Tashiro, M, Chiba, J, Sata, T, Kurata, T, Hasegawa, H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. Microbes Infect 9: 1333-1340 (2007)

Asahi-Ozaki, Y, Itamura, S, Ichinohe, T, Strong, P, Tamura, S, Takahashi, H, Sawa, H, Moriyama, M, Tashiro, M, Sata, T, Kurata, T, Hasegawa, H. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect* 8: 2706-2714 (2006)

Horimoto, T, Takada, A, Fujii, K, Goto, H, Hatta, M, Watanabe, S, Iwatsuki-Horimoto, K, Ito, M, Tagawa-Sakai, Y, Yamada, S, Ito, H, Ito, T, Imai, M, Itamura, S, Odagiri, T, Tashiro, M, Lim, W, Guan, Y, Peiris, M, Kawaoka, Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24, 3669-3676 (2006)

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol*. 86: 2269-74 (2005)

Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu-Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis*. 58: 88-94 (2005)

Bart L Haagmans, Thijs Kuilen, Byron E Martina, Ron A M Fouchier, Guus F Rimmelzwaan, Geert van Amerongen, Debby van Riel, Ton de Jong, Shigeyuki Itamura, Kwok-Hung Chan, Masato Tashiro, and Albert D M E Osterhaus. Pegylated interferon- α protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature Medicine* 10: 290-293 (2004)

Tran Tinh Hien, Nguyen Thanh Liem, Nguyen Thi Dung, Luong Thi San, Pham Phuong Mai, Nguyen van Vinh Chau, Pham Thi Suu, Vo Cong Dong, Le Thi Quynh Mai, Ngo Thi Thi, Dao Bach Khoa, Le Phuc Phat, Nguyen Thanh Truong, Hoang Thuy Long, Le Truong Giang, Nguyen Dac Tho, Nguyen Thi Kim Tien, Le Hoang San, Le Van Tuan, Christiane Dolecek, Tran Tan Thanh, Menno de Jong, Constance Schultsz, Peter Cheng, Wilina Lim, Peter Horby, the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (N. Bhat, P. Brudon, P. Calain, A. Curns, R. Doran, K. Fukuda, T. Grein, P. Horby, S. Itamura, N. Miranda, T. Uyeki), and Jeremy Farrar. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350: 1179-1188 (2004)

Iwasaki, T., Itamura, S., Nishimura, H., Sato, Y., Tashiro, M., Hashikawa, T., Kurata, T. Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol.* 108: 485-492 (2004)

Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto S, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol.* 16: 1423-30 (2004)

Naomi Takasuka, Masayoshi Enami, Shigeyuki Itamura, and Toshitada Takemori. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. *Vaccine* 20: 1579-1585 (2002)

Hidekazu Nishimura, Shigeyuki Itamura, Takuya Iwasaki, Takeshi Kurata, Masato Tashiro. Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice : neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J.Gen.Virol.* 81, 2503-2510 (2000)

Ayato Takada, Noritaka Kuboki, Katsunori Okazaki, Ai Ninomiya, Hiroko Tanaka, Hiroichi Ozaki, Shigeyuki Itamura, Hidekazu Nishimura, Masayoshi Enami, Masato Tashiro, Kennedy F. Shortridge, Hiroshi Kida. Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential Human pandemic. *J.Virol.* 73, 8303-8307, (1999)

Shengqiang Li, Jerome Schulman, Shigeyuki Itamura and Peter Palese. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *J.Virol.* 67, 6667-6673 (1993)

Shigeo Sugita, Yasuyuki Yoshioka, Shigeyuki Itamura, Yumi Kanegae, Keiko Oguchi, Takashi Gojobori, Kuniaki Nerome and Akira Oya. Molecular evolution of hemagglutinin genes of H1N1 swine and human Influenza viruses. *J.Mol.Evol.* 32, 16-23 (1991)

Atsushi Endo, Shigeyuki Itamura, Hisae Iinuma, Shin-ichi Funahashi, Hisatoshi Shida, Fusaoki Koide, Kuniaki Nerome and Akira Oya. Homotypic and heterotypic protection against influenza virus infection in mice by recombinant vaccinia virus expressing haemagglutinin or nucleoprotein gene of influenza virus. *J.Gen.Virol.* 72, 699-703 (1991)

Shin-ichi Funahashi, Shigeyuki Itamura, Hisae Iinuma, Kuniaki Nerome, Masanobu Sugimoto and Hisatoshi Shida. Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. *J.Virol.* 65, 5584-5588 (1991)

Shigeyuki Itamura, Yuko Morikawa, Hisatoshi Shida, Kuniaki Nerome and Akira Oya. Biological and immunological characterization of influenza virus haemagglutinin expressed from the haemagglutinin locus of vaccinia virus. *J.Gen.Virol.* 71, 1293-1301 (1990)

Shigeyuki Itamura, Hisae Inuma, Hisatoshi Shida, Yuko Morikawa, Kuniaki Nerome and Akira Oya. Characterization of antibody and cytotoxic T lymphocyte responses to human influenza H3 haemagglutinin expressed from haemagglutinin locus of vaccinia virus. J.Gen.Virol.71, 2859-2865 (1990)

Katsuya Shigesada, Shigeyuki Itamura, Masanari Kato, Masakazu Hatanaka, Mutsuo Imai, Minoru Tanaka, Naoki Masuda, Jun Nagai and Kunio Nakashima. Construction of a new plasmid vector that can express cloned cDNA in all translational reading frames. Gene 53, 163-172 (1987)

Shigeyuki Itamura, Katsuya Shigesada, Mutsuo Imai, Nobuyuki Kobayashi, Toshinari Hamakado, Takahiro Harada and Masakazu Hatanaka. Expression of the gag gene of human T-cell leukemia virus type I in Escherichia coli and its diagnostic use. Gene 38, 57-64 (1985)

・平成 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発に関する研究

平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：インフルエンザワクチン需要予測に関する研究

課題番号：H22-新興-指定-020

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：三浦 宜彦

所属研究機関：埼玉県立大学

所属部局：

職名：学長

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 9,226,000円 2年目 7,010,000円 3年目 6,446,000円 計 22,682,000円

I. 研究の意義

- (1) わが国におけるインフルエンザワクチンの接種状況は、予防接種法に基づく高齢者の接種状況を除いて、把握する方法がない。
- (2) インフルエンザワクチンの製造には時間を要するにも関わらず、次シーズンのインフルエンザワクチンの需要量を予測することができない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) わが国における世代別のインフルエンザワクチン接種状況を把握する。
- (2) 次シーズンのインフルエンザワクチンの需要量を予測する。
- (3) 過去10年間に蓄積されたデータによってインフルエンザワクチンの接種状況および需要量の今後の動向を予測する。
- (4) 過去10年間のインフルエンザの需要予測をまとめ、その有効性を検証し、その限界と課題を検討することによって、将来にインフルエンザをはじめワクチンあるいは他の医療資源の需要予測が必要になった際の資料を提供する。

III. 3年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

・研究代表者

- (1) 医療機関等への調査および住民を対象とした調査を総括して、インフルエンザワクチンの接種状況を推計するとともに、次シーズンにおける需要量の予測を行った。
- (2) 過去10年にわたる医療機関調査および住民調査に基づくインフルエンザワクチンの需要予測の結果について総括を行う(最終年度予定)。

・研究分担者(渡辺由美)

- (1) 医療機関等への調査によって、インフルエンザワクチンの世代別接種者数、接種率、接種回数別割合を推計した。
- (2) 過去10年にわたる医療機関調査のデータの蓄積をもとに、過去の接種率推計法を検討し、より適切な接種率の推定法を検討する(最終年度予定)。

・研究分担者(延原弘章)

- (1) 医療機関等への調査によって、次シーズンにおけるインフルエンザワクチンの需要量と世代別接種者数、接種率の予測を行った。
- (2) 過去10年にわたる医療機関調査に基づくインフルエンザワクチンの需要予測をまとめ、その有効性を検証し、限界と課題を検討する(最終年度予定)。

・研究分担者(大日康史)

- (1) 住民を対象としたインフルエンザワクチン接種意向調査によって、次シーズンにおけるインフルエンザワクチンの需要量と世代別接種者数、接種率の予測を行った。
- (2) 過去10年間実施された住民調査に基づくインフルエンザの需要予測では、概ね誤差率が10%以内であり、十分な精度があったことが示された。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 今後のわが国におけるインフルエンザワクチンの接種率等を継続的に把握する(本研究以外にすべての世代に対して全国レベルで接種状況を把握する体制がない)。
- (2) インフルエンザの流行状況とワクチン接種率の経年的な変化から、ワクチンの有効性を検討する。
- (3) 将来における予防接種制度等の環境の変化に伴うインフルエンザをはじめとするワクチン、あるいは他の医療資源の需要予測を、継続的かつ迅速に、また的確に行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 厚生労働省のインフルエンザワクチン需要検討会に、本研究による次シーズンのインフルエンザワクチン需要量の予測結果を提供し、それに基づき供給計画が立てられた。
- (2) わが国における今後のインフルエンザワクチン接種率および需要量の将来動向を検討する資料となりうる。
- (3) 将来における予防接種制度等の環境の変化に伴うインフルエンザをはじめとするワクチン、あるいは他の医療資源の需要予測を行う際の方法論を確立した。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。