

府からの輸出許可が間に合わなかったとして詳細な補足説明がなされなかった。特に、フェレット馴化ウイルスの病原性の記載については、経鼻接種と気管内接種による致死性の違いについて十分な理解を得られなかったようである。そこで、この点を明記した別の補足論文が発表されている4)。最終的には、新たな研究成果に関する追加説明、誤解を招いた表現の訂正、バイオセフティー・バイオセキュリティの確保に関する補足記載などの修正条件を付して、全文をそのまま公表することが勧告された9)。評決においては、Wisconsin 大学グループの論文については全員一致で公表が認められたが、Rotterdam 大学の論文については、反対票が1/3 を占め、依然として研究実施への不信感や dual use への懸念が残っていることが推察される。この NSABB による再検討の前日に、米国政府はバイオ研究におけるセキュリティ確保に関する指針を発表した10)。この措置も、NSABB による前回の判断を撤回させ、再審査への伏線として準備されたものと考えられる。その後、WHO は2月の専門家会議での合意条件となった当該ウイルスのバイオセフティーレベル評価と、ウイルス提供国であるベトナムおよびインドネシアへの背景説明を行い、論文公表への条件を整えた。

一方、米国とオランダ規制当局は、両研究施設のバイオセフティー・バイオセキュリティの管理状況に対する査察・評価を行い、何れも問題が無いとの結論を出した。Wisconsin 大学河岡教授ら研究グループの論文は5月2日に公表され、各国のパンデミック準備対策の再検討のために活用されている2)。これに対して、Rotterdam 大学グループの論文については、オランダ政府が、バイオテロへの悪用が懸念される当該論文の原稿を国外(米国)の出版社へ投稿送付す

ることは、輸出規制法に定められた国の安全保障に関わる重要情報の国外への持ち出し行為に当たるとして、著者に対して輸出許可申請をするように要求した。これに対して研究責任者の Ron Foucher が反発する事態も起こったが、オランダ政府がこれに関する専門家会議を開催して議論された。結局、著者が輸出許可を求めることとなり、その結果、輸出許可が下されて、5月中旬に最終原稿が出版社に送付された。その後、査読過程が進んでいると思われるが、現時点(2012年6月5日)では、まだ出版されていない。従って、ヒト型に変化した H5N1 ウイルスに関する研究の自粛・凍結は未だ解除されていない。

5. ウイルス学研究における dual use 問題

以上が、H5N1 インフルエンザウイルスの研究論文の公表に関する経過概要であるが、この間に議論された科学技術・科学知識の悪用 dual use の問題については、未だ何も解決していない。

一般に、dual use はテロなどへの悪用という否定的な意味で語られることが多いが、軍事関係者の間では、dual use は科学技術を軍事応用すると言う意味で、むしろ積極的に評価する立場から使用される場合も多い。科学知識・科学技術の進歩は、多かれ少なかれ様々な人の活動に応用されてきた。人類の歴史の中で、科学研究者や技術者、また特に専門家に特化せずとも多くの人々は、周辺の事象に対する素朴な疑問の究明から、科学真理の探究に至る様々な研究活動や、また日常生活の改善、より良い社会生活の実現、さらに人類全体の幸福を目的とした様々な領域における技術開発、技術改良を行ってきた。その多くは、純粋な科学的好奇心を満足させることや、より良い生活手段、生活様式の実現を目的としてきたものであったであろう

が、逆に、それらが人を傷つける目的や、戦争やテロの手段として応用（悪用）されてきたことも事実である。有名な例では、19 世末の土木工事や鉱山採掘に使用されていたピクリン酸という危険な液体爆発物の代わりに、安全に取り扱えるダイナマイトを開発して、20 世紀の驚異的な産業発展に多大な貢献をしたアルフレート・ノーベルの偉業が思い浮かぶ。しかし、そのダイナマイトは第 1 次世界大戦で大きな役割を果たした。同様な事例は、人工染料の開発から医薬品開発へと進歩した有機化学が、大量殺人を目的とした毒ガス兵器の開発に応用されたこと、また人類の夢であった飛行機の発明が直ちに軍事目的に応用され、さらにロケットなどの大量破壊兵器の開発に結び付いたこと、核物理学の基礎研究が、原子力エネルギーの平和利用・実用化が図られるよりも早く核兵器に応用され、たちまち人類の絶滅をもたらす危機状況を作り出してしまったことなど、枚挙にいとまない。原子力研究やロケット研究などの軍事目的に応用される可能性の高い開発研究分野では、敵性国やテロリストに対する利敵行為になるとして、研究成果に対する規制は厳しく、公表は全くと言ってよいほど行われていない。

ウイルス学研究における dual use に限って問題を考えると、これまでの悪用される可能性は指摘されてはいたが、主にバイオセーフティ・バイオセキュリティの規制については、実際には研究者の自主的な判断や対応に依存してきたのが現状である。しかし、今後は、研究情報・研究成果の悪用やウイルスの漏出・盗難を防ぐ有効な対策を検討し、確実に実施するという責務と、これらの重要な研究を安全に推進し、その情報を関係者間で共有して、感染症流行による最悪の事態に対して速やかに備えるという、二律背反の状況に

対処する必要がある。両者の立場の見解・指摘は何れも重要な課題であるので、本問題の解決には、国際的な幅広い検討に基づいたバランスの取れた合意が必要である。各研究者は、このような問題が存在することを認識して、安全の確保に努めつつ、研究を進める必要がある。しかし、Dual use への懸念を強調し過ぎると、一切の研究の実施、成果の公表は、悪用される可能性が否定されない限り、制限・規制せざるを得なくなる。Dual use の議論を開始することは、パンドラの函を開けることである。議論は必要ではあるが、議論の到達点、落とし所をきちっと認識しておかないと、不毛の議論に終わるのみならず、問題が次々を湧き出てきて、收拾を図ることが不可能な迷路に嵌まり込むことになる可能性がある。

今回の H5N1 鳥インフルエンザウイルスをめぐる研究の結果、甚大な健康被害と社会的影響という最悪のシナリオで起こる強毒型パンデミックの出現リスクは、予想外に高いとの警鐘が鳴らされた。多くの未確定要素はあるものの、未曾有の健康危機・社会危機状況に対する危機管理体制の再構築、即ち、科学的なリスク評価に基づく「最悪のシナリオ」の見直しと、具体的な事前準備と緊急対応計画の再検討、およびその実施が緊急課題である。

参考文献

- 1) CDC 論文, Virology 2011.
- 2) Imai, M., Nature 2012.
- 3) Ron Foucher, Malta での ESWI シンポ抄録, 2011.
- 4) Ron グループ, 継鼻と経気管接種の違いに関する論文 2012.
- 5) CDC 続報 2012.

- 6) NSABB 1st 報告 (NIH Homepage) Dec. 2011.
- 7) moratorium 宣言, 2012 Nature, Science.
- 8) WHO 2 月合意報告, WHO Homepage.
- 9) NSABB 最終報告, NIH Homepage, March 2012.
- 10) 米国保健省のガイドライン, NIH Homepage, March 2012.

F. 結論

新型インフルエンザ大流行による社会危機状況に対しては、最悪のシナリオを想定した、国による十分な事前準備と有効な緊急対応が必須となる。甚大な健康被害と社会的影響という最悪のシナリオで起こる H5N1 強毒型パンデミックの出現リスクは、予想外に高いことが強く示唆されている。この場合の健康被害は、現在で国が「想定」している最悪のシナリオ（スペインかぜインフルエンザ程度の致死率 2%；しかし最近、日本における健康被害はこの数倍はあり、当時の他の途上国と同様であったと指摘されている）を遥かに超えることが予想される。

「想定外」に対する準備・対応を怠ってきた 2011 年の東日本大震災からの重い教訓をもとに、平成 23 年 9 月 20 日に新型インフルエンザ対策閣僚会議で決定された新型インフルエンザ対策行動計画については、科学的基盤に立ったリスク評価に基づいた「最悪のシナリオ」の再検討が必要である。

一方、国による対策計画を実施可能にするためには、国の実施権限と地方自治体や民間・諸機関に対する協力要請・指示などに関する法的基盤が必要だが、我が国には、これらが欠落していることが (H1N1)2009 パンデミックからの重要な教訓の一つである。これに応じて、国家危機・社会危機などの緊急事態に対応した健康危機管理に関する新型イ

ンフルエンザ等特別措置法が制定されたが、これは、感染症による社会危機に際して、緊急事態宣言がなされた後の国の緊急対応の基本を決めたものであり、それに必要な事前準備に対する対応が欠落した欠陥を持っている。これに対する具体的な問題提起と、国民の健康と安全を確保するための対策の見直しが必要である。

一方、現在の鳥型ウイルスがヒト型に変異する機序の解明に基づいた、動物とヒトでのサーベイランスの実施とリスク評価方法を確立する必要がある。その実績に基づいて、未曾有の危機状況に対する危機管理体制の再構築、即ち、具体的な事前準備と緊急対応計画の再検討とその実施が緊急課題である。

現時点では最も発生の可能性が高く、一旦発生すれば大きな健康被害と社会機能の崩壊にも至ると危惧されている強毒性 H5N1 パンデミックに対しては、プレパンデミックワクチンの事前接種による基礎免疫を賦与することで、その健康被害をある程度抑制されると期待される。

プレパンデミックワクチンの事前接種戦略無しには、この最悪のシナリオには対応が極めて困難である。パンデミックの予測、リスク評価にもとづいたプレパンデミックワクチンの活用（事前接種）による健康被害の最小化と社会機能の維持する戦略を確立して実施する必要がある、そのためには、より多数の人を対象とした臨床研究を実施して、安全性と有効性を検証することが必須である。

G. 研究発表

分担研究者の研究発表については、各分担報研究報告書に記載。

- Shirakura, M., Kawaguchi, A., Tashiro, M., Nobusawa, E.
The composition of hemagglutinin and neuraminidase affects antigen yield of A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66 65-68 2013
- Kobayashi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tsukagoshi, H., Saitoh, M., Ishioka, T., Yokota, Y., Kimura, H., Tashiro, M., Kozawa, M.
Novel reassortant influenza A (H1N2) virus derived from A(H1N1)pdm09 virus isolated from swine, Japan, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19 1972-1974 2013
- Hamamoto, I., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N.
High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7-like gene. *PLoS ONE* 10 1371 2013
- Hamamoto, I., Harazaki, K., Inase, N., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N.
Cyclosporin A inhibits propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66(4) 276-283 2013
- Takashita, E., Ejima, M., Fujisaki, S., Kishida, N., Xu, H., Imai, M., Yamashita, K., Kim, N., Sato, A., Sugawara, H., Itoh, R., Doi, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tashiro, M., Odagiri, T.,
The Influenza Virus Surveillance Group of Japan
Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *J. Influenza. Other Respir Viruses.* 7(6) 1390-1399 2013
- Fujisaki, S., Imai, M., Takashita, E., Taniwaki, T., Xu, H., Kishida, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tashiro, M., Odagiri, T.
Mutations at the monomer-monomer interface far from the active site of influenza B virus neuraminidase cause reduced susceptibilities to neuraminidase-inhibitor drugs. *J. Infect. Chemother* 19(5) 891-895 2013
- Fouchier, R.A.M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W.S., Bouvier, N.M., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Compans, R.W., Couch, R.B., Cox, N.J., Doherty, P.C., Donis, R.O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Kiselev, O., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T.C., Osterhaus, A.D.M.E., Palese, P., Peiris, J.S.M., Perez, D.R., Richit, J.A., Schultz-Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swayne, D.E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J.K., Thomas, P.G., Tripp, R.A., Tumpey, T.M., Webby, R.J., Webster, R.G.
Avian flu transmission research resumes. *Science* 339(6119) 520-521 2013
- McKimm-Breschkin, J.L., Williams, J., Barrett, S., Jachno, K., McDonald, M., Mohr, P., Saiito, T., Tashiro, M.

- Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 68(10) 2210-2221 2013
- Kushibuchi, I., Kobayashi, M., Kusaka, T., Tsukagoshi, H., Ryo, A., Yoshida, A., Ishii, H., Saraya, T., Kurai, D., Yamamoto, N., Kanou, K., Saitoh, M., Noda, M., Kuroda, M., Morita, Y., Kozawa, K., Oishi, K., Tashiro, M., Kimura, H.
Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect. Genetics Evol.* 18 168-173 2013
- Ainai, A., Tamura, S-I., Suzuki, T., vanRiet, E., Ito, R., Odagiri, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H.
Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 9(9) 1-8 2013
- Kageyama, T., Fujisaki, S., Takashita, E., Xu, H., Yamada, S., Uchida, Y., Neumann, G., Saito, T., Kawaoka, Y., Tashiro, M.
Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *EuroSurveill.* 18(15) 11 2013
- Sriwilaijaroen, N., Magesh, S., Ando, H., Ishida, H., Sakai, M., Ishitsubo, E., Hori, T., Moriya, S., Ishikawa, T., Kuwata, K., Odagiri, T., Tashiro, M., Hiramatsu, H., Tsukamoto, K., Miyagi, T., Tokiwa, H., Kiso, M., Suzuki, Y.
A novel potent and highly specific inhibitor against influenza viral NI-N9 neuraminidases. *Nature Chem. Biol.* 2013submitted
- Watanabe, T., Kiso, M., Fukuyama, S., Nakajima, N., Imai, M., Yamada, S., Murakami, S., Yamayoshi, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Sakoda, Y., Takashita, E., McBride, R., Noda, T., Hatta, M., Imai, H., Zhao, D., Kishida, N., Shirakura, M., deVries, R.P., Shichinohe, S., Okamoto, M., Kawakami, E., Ishikawa, I., Watanabe, S., Ito, M., Sakai-Tagawa, Y., Sugita, Y., Uraki, R., Yamaji, R., Einfeld, A., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E.A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J.C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y.
Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501 551-555 2013
- Kishida, N., Imai, M., Xu, H., Taya, K., Fujisaki, S., Takashita, E., Tashiro, M., Odagiri, T.
Seroprevalence of a novel influenza A(H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66 549-511 2013

Members of the Western Pacific Region
Global Influenza Surveillance and
Response System; Dwyer, D., Barr, I., Hurt,
A., Kelso, A., Reading, P., Sullivan, S.,
Buchy, P., Yu, H., Zheng, J., Shu, Y., Wang,
D., Lam, W., Aguon, A., Oliva, R.Q.,
Odagiri, T., Tashiro, M., Verasahib, K.,
Yusof, M.A., Nymadawa, P., Alexander, B.,
Gourinat, A.-C., JGrangeon, J.-P.,
Jennings, L., Huang, S., Horwood, P.,
Lucero, M., Roque, V. Jr., Suy, L.L.,
Cardon, P., Tandoc, A. III., Olveda, R.M.,
Chun, K., Park, Y.-J., Cutter, J., Lin, R.,
Low, C., Mai, L.T.Q., Balish, A., Kile, J.,
Mei, S., Mcfarland, J., Moen, A., Olsen,
S., Samaan, G., Xi, X., Chea, N., Diorditsa,
S., Feldon, K., Fox, K., Jamsran, M.,
Konings, F., Lewis, H.C., McPherson, M.,
Nilles, E., Olowokure, B., Partridge, J.
Seasonal influenza vaccine policies,
recommendations and use in the World
Health Organization' s Western Pacific
Region.

Western Pacific Surveillance and Response
(WPSAR) Journal 4 51-59 2013

Miyazaki, M., Nishihara, H., Hasegawa, H.,
Tashiro, M., Wang, L., Kimura, T., Tanino,
M., Tsuda, M., Tanaka, S.

NS1-binding protein abrogates the
elevation of cell viability by the
influenza A virus NS1 protein in
association with CRKL.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 441(4)
953-957 2013

Kuroda M., Niwa, S., Sekizuka, T.,
Tsukagoshi, H., Yokoyama, M., Ryo, A.,

Sato, H., Kiyota, N., Noda, M., Kozawa, K.,
Shirabe, K., Kusaka, T., Shimojo, N.,
Hasegawa, S., Sugai, K., Tashiro, M.,
Oishi, M., Ishii, H., Kimura, H.,
Molecular evolution of the VP1 and VP3
genes in human rhinovirus species C
J. Virol. 2013 submitted

Barr, I.G., Besselaar, T.G., Cox, N.J.,
Daniels, R.S., Donis, R., Engelhardt, O.G.,
Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A.,
McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C.,
Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D.,
Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X.,
Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the
World Health Organization Consultation on
Northern Hemisphere Influenza Vaccine
Composition for 2013-4)

WHO recommendations for the viruses to be
used in the 2013-14 Northern Hemisphere
Influenza Vaccine: Epidemiology,
antigenic and genetic characteristics of
influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B
influenza viruses collected from October
2012 to January 2013.

Vaccine 2014 in press

World Health Organization /World
Organisation for Animal Health/Food and
Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO)
H5N1 Evolution Working Group: Bahl, J.,
Besselaar, T., Brown, I.H., Capua, I.,
Chen, H., Cox, N., Claes, F., Davis, C.T.,
Donis, R.O., Fouchier, R.A.M., Guan, Y.,
Hamilton, K., Jang, Y., Kawaoka, Y., Kelso,
A., McCauley, J., Mumford, E., Prajitno,
T., Russell, C.A., Smith, D., Smith,
G.J.D., Shu, Y., Tashiro, M., Shepard, S.,

- Vijaykrishna, D., Webby, R., Webster, R., Wong, F.
Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses.
Influenza and other respiratory viruses
doi: 10.1111/irv.12230
2014 Epub ahead of print
- Kageyama, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Tashiro, M.
Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.
J. Virol. Methods 2013 submitted
- Takashita, E., Ejimam, K., Itoh, R., Miura, M., Ohnishi, A., Nishimura, H., Odagiri, T., Tashiro, M.
A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013
EuroSurveill. 19(1) 2014
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Kengo Nishimura, K., Misawa, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H.L.K., Mai T.Q. Le, Dang, G.T., Long T. Nguyen, Tashiro, M., Kageyama, T.
Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.
J. Clin. Microbiol. 2014 submitted
- WHO writing group of consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
Consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
WER 89 29-34 2014
- WHO writing group of WHO external quality assessment programme (EQAP) for influenza viruses by polymerase chain reaction (PCR) Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013
WER 89 37-44 2014
- Shaw, I., Ciblak, M., Gabriel, G., Guthmann, J.-P., Heinz, F., Kunze, M., Kunze, U., Kyncl, J., Lina, B., Monto, A., Openshaw, P., Osterhaus, A., Prymula, R., Tashiro, M., Essen, T.V., Vanlangendonck, C., Ranst, M.V., Van-Tam, J.N.; Wagner, R.
Pandemic Influenza Preparedness: Key findings from a European survey.
Health Policy 2014 submitted
- Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzaki, Y., Aina, A., Nakatsu, Y., Nagata, N., Kanou, K., Komase, K., Nobusawa, E., Maenaka, K., Kuroda, M., Hasegawa, H., Kawaokaj, Y., Tashiro, M., Takeda, M.
The host serine protease TMPRSS2 is essential for pathogenicity of influenza A virus.
J. Virol. doi:10.1128/Jvi.03677-13 2014

- Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T., Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):897-908 2012
- Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429: 51-56 2012
- Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011 *Vaccine.* 30(45):6461-71, 2012.
- Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokot. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 19-27 2012
- Sriwilaijaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.* 94(2):139-46, 2012.
- Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kuniyoshi, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro, M. Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65:363-367, 2012.
- Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S.,

- Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A/H1N1pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods* 12/2012; DOI:10.1016/j.jviromet.2012.12.005 2012
- WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M. Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. G.) Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *J. Influenza. Other Resp. Virus.* 6:1-5, 2012
- Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. *ACS Chem Biol.* 16;7(3): 552-62 2012
- Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 84(2): 336-44 2012
- Asanuma, H., Zamri, N. B., Sekine, S., Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Gilbert, R. S., Fukuiwa, T., Sata, T., Tashiro, M., Fujihashi, K. A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging. *Vaccine* 30: 803-812, 2012.
- Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., 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., Tsunetsugu-Yokota, Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies *Jpn. J. Infect. Dis.:* 65, 19-27, 2012
- Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System (Cook, A. R., Barr, I., Hurt, E., Kelso, A., Reading, R., Ly, S., Seng, H., Buchy, p., Ung, S. A., Shu, Y., Xu, C., Xu, Z., Wang, D., Kama, M., Singh, P., Fujisaki, F., Odagiri, T., Tashiro, M., Archkhawongs, S., Khamphongphanh, B., Vongphrachanh, P., Kheong, C. C., Ismail, N., Burmaa, A., Darmaa B., Nymadawa, P., Grangeon, J.-P., Gourinat, A.-C., Huang, Q. S., Lopez, L. D., Juan M Lopez, J. M., Olveda, R. M., Roque, V., Jennings, L., Kang C., Lin, C., Lin, R., and Tee, W. S. N., Balish, A., Corwin, A., Kapella, B. K., Kitsutani, P., McFarland, J., Moen, A., Xu, X., Hoang, V.M.P., Long, N. L., Mai, L. Q., Hang, L. K. N., Nguyen, H. A., Nguyen, T.

- L., Nguyen, T. N., Asgari, N., Dawainavesi, A., Denehy, E. J., Dominguez, M. N., Jamsran, M., Kasai, T., Kool, J., Lewis, H., Luo, D., Olowokure, B., Partridge, J., Pavlin, B., Samaan, G., Singh, H., Tsuyuoka, R., Vakacegu A., Zhang, Z.)
Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006–2010. *PLoS One*. 2012;7(5):e37568.
- Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol*. 61(Pt 6):820–9, 2012
- Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID*. 66(2013) pp.65–68.
- Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010–11. *Virus Res*. 170: 109–117, 2012
- Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Pause on avian flu transmission research. *Science*. 335: 400–1, 2012
- Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Pause on avian flu transmission studies., *Nature* 481: 443, 2012
doi:10.1038/481443a 2012
- Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H.,

Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., O. Kiselev, Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu. Nature 493: 460, 2013. doi:10.1038/nature11858 2013

Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Yamamoto, K., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. Vaccine 31 2184-2190 2013

今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版) 国立感染症研究所 2012
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf

今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井

善宏、皆川洋子、調恒明. インフルエンザ診断マニュアル(第2版) 国立感染症研究所 2012,
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf

2. 学会発表 省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し

2. 実用新案登録
無し

3. その他

I. 行政施策への貢献の可能性

1. 本研究で、高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応するために重要なアミノ酸を特定することにより、新型インフルエンザ出現の可能性を予知または早期発見することができ、迅速な対応施策立案に貢献することができる。

2. これまでの遺伝子、抗原性変異のみの監視では検出不可能であった、ヒト型受容体変異を地球規模で直接監視する体制確立が可能となる。

3. ワクチンを補填し、これまでの抗インフルエンザ薬耐性株にも有効で、備蓄可能な次世代抗インフルエンザ薬の開発基盤が達成される。

4. 社会・経済機能を破綻させないためのインフルエンザ流行動向監視体制および事前準備の提言。

5. 万一、社会・経済機能が破綻した状況下での地域レベルでのインフルエンザ対策の

提言。

6. 適切な投与方法を定めた抗インフルエンザ薬の使用指針の提言。

7. インフルエンザパンデミック対策における哺乳動物の公衆衛生学的重要性を発信し、対策を提言。

ウイルスの宿主域規定要因と人への馴化機構、 ウイルス病原性の分子基盤の解明

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの伝播は、今のところ限られている。しかしヒトへ適応する変異が入った場合、パンデミックを引き起こす可能性がある。そこで、ヒトへの適応変異の知見を蓄積するために、H5N1 ウイルス感染者から分離されたウイルスのアミノ酸変異を解析した。その結果、感染後に患者体内で変化したと思われる患者固有のアミノ酸変異と、感染後の日数変化に伴い出現したアミノ酸変異を確認した。

次に、ベトナムにてヒトおよび鳥から分離された H5N1 ウイルスについて、ニワトリ肺線維芽細胞 (DF-1)、イヌ腎臓由来細胞 (MDCK)、ヒト II 型肺胞上皮培養細胞 (A549) における増殖性の比較を行った。その結果、DF-1 細胞ではどの株も効率よく増殖し差は認められなかったが、MDCK 細胞および A549 細胞では増殖性に差が認められた。そこで、A549 細胞での増殖性が高いヒト分離株、A549 細胞での増殖性が低い鳥分離株を用いて解析を行った結果、両株の増殖の差に関与する、これまでに報告のない 3 つの新規アミノ酸を特定した。本研究で明らかになったアミノ酸は、分離された H5N1 ウイルスのリスク評価に有効なツールとなる可能性がある。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは時にヒトに感染するが、ヒトからヒトへの伝播は感染者への濃厚接触のみで、ほとんど例がない。ヒト体内で増殖しやすく、ヒトからヒトへ伝播しやすくなった場合、H5N1 ウイルスがパンデミックを引き起こす可能性がある。どのような変異が起きるとヒトで増殖・伝播しやすくなるかについての知見を蓄積し、分離ウイルスのリスク評価のための判断材料とすること、さらに H5N1 ウイルスのヒトへの適応メカニズムを

明らかにすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

- ① 2009 年および 2010 年のベトナムにおける H5N1 感染者から分離したウイルスを、データベース上の鳥由来 H5N1 ウイルス株と比較解析した。さらに、同一患者から異なる複数の日に分離したウイルスを用い、同一個体内でのウイルス遺伝子の経時的変化を調べた。
- ② 2009 年から 2010 年にかけて、ベトナムにてヒトから分離された 8 株、およ

び鳥から分離された2株、計10株のH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて、ニワトリ肺線維芽細胞(DF-1)、イヌ腎臓由来細胞(MDCK)、ヒトII型肺胞上皮培養細胞(A549)における増殖能を比較解析した。さらに、ヒトの細胞で増えやすい株と増えにくい株の増殖性の違いに関与する変異を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床患者から分離したウイルスを用いるため、東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を受け、実施している。承認番号：21-69-220427

C. 研究結果

- ① 2010年にベトナムにおいてH5N1感染者から分離した4株H5N1ウイルスについて塩基配列を解析し、既存のウイルス遺伝子配列と比較したところ、それぞれ患者固有の特異的アミノ酸変異が認められた。さらに、感染後のヒト体内でのアミノ酸変異を解析するため、3人の患者からそれぞれ異なる日に分離されたウイルスについて解析したところ、日数変化に伴いアミノ酸変異が出現することが確認できた。これらのアミノ酸変異は、主にPB1, PA, HA, NA, M2蛋白質に認められた。特にM2蛋白質では異なる患者で同一の変異が確認された。
- ② 2009年から2010年にかけて、ベトナムにてヒトから分離された8株および鳥から分離された2株、計10株のH5N1ウイルスについて、各種細胞での増殖性を解析した結果、DF-1細胞では10株とも効率よく増殖したのに対し、MDCK細胞では増殖能の最も高い株と最も低い株との間で 10^4 PFU/mlの差が認められた。A549

細胞では高い増殖性を示す株があったが、一方で鳥分離株のうちの1株は全く増殖できず、株間に大きな差が認められた。

本研究は、ヒト細胞における高増殖性に関わり、まだ同定されていないアミノ酸を特定することが主眼である。したがって、哺乳動物細胞、及びヒトの細胞における高増殖性に関わることが報告されているアミノ酸配列を持たず、A549細胞で効率よく増殖する株に注目することにした。PB2の627番目、591番目、701番目、270番目、158番目のアミノ酸は哺乳動物細胞での高増殖性に関与することが知られている。そこで、これらのアミノ酸を持たず、A549細胞で効率よく増殖したヒト分離株、A549細胞で増殖しにくかった鳥分離株の遺伝子配列を比較することで、2株間の増殖の差に関わるアミノ酸配列の特定を試みた。

ヒト分離株、鳥分離株の遺伝子を元に、組み換えウイルスを作成した。組み換えウイルスのA549細胞における増殖を観察することで、PB2セグメントが2株間の増殖の差に最も関わっていることを示した。更に、数種類のPB2キメラを作成し増殖を比較することで、PB2の中で最も増殖に関与している部分を特定した。最後に、PB2遺伝子に点変異を入れた変異ウイルスを作成し、A549細胞における増殖を比較することで、2株間の増殖の差に関わる3つのアミノ酸を特定した。

3つのアミノ酸のうちの1つは単独変異で2株間の増殖に関与する。残り2つのアミノ酸は同時に変異が入ることにより、鳥分離株のA549細胞における効率よい増殖に寄与することが明らかとなった。

データベースに掲載されている様々な亜型、宿主の分離株がこれらのアミノ酸を持つかどうか検証した結果、1つのアミノ酸はH5N1 ウイルスを含め、殆どのインフルエンザウイルス株で高率に保存されており、ヒトへの適応に関わっている可能性は低いと考えられた。一方で、別の1つのアミノ酸は2006年以降に分離された季節性H3N2 インフルエンザウイルスの30%超で保存されており、ヒトへの適応に関わっている可能性があることが示唆された。

D. 考察

本研究で明らかとなったアミノ酸は、分離されたH5N1 ウイルスのリスク評価を行う上で、マーカーとして使用できる可能性がある。

E. 結論

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの、ヒト細胞における効率の良い増殖に関与するアミノ酸を新たに特定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko Y, Takimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. *Vaccine* 31:6239-6246, 2013.

Sugita Y, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y. The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. *J Virol* 87:12879-12884, 2013.

Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y. The genome packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome bundling signal. *J Virol* 87:11316-11322, 2013.

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501:551-555, 2013.

Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. *J Virol* 87:7874-7881, 2013.

Kiso M, Takano R, Sakabe S, Katsura H, Shinya K, Uraki R, Watanabe S, Saito H, Toba M, Kohda N, Kawaoka Y. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Sci Rep* 3:1563, 2013.

Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* 87:2455-2462, 2013.

Uraki R, Kiso M, Shinya K, Goto H, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Takahashi K, Daniels RS, Hungnes O, Watanabe T, Kawaoka Y. Virulence determinants of pandemic A(H1N1)2009 virus in a mouse model. *J Virol* 87:2226-2233, 2013.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in Cytokine Production in Human Macrophages and in Virulence in Mice Are Attributable to the Acidic Polymerase Protein of Highly Pathogenic Influenza A Virus Subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular mechanisms underlying

oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

Noda T, Sugita Y, Aoyama K, Hirase A, Kawakami E, Miyazawa A, Sagara H, Kawaoka Y. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat Commun* 3:639, 2012.

Victor ST, Watanabe S, Katsura H, Ozawa M, Kawaoka Y. A replication-incompetent PB2-knockout influenza A virus vaccine vector. *J Virol* 86:4123-4128, 2012.

Watanabe T, Imai M, Watanabe S, Shinya K, Hatta M, Li C, Neumann G, Ozawa M, Hanson A, Zhong G, Fukuyama S, Kawakami E, Simmons HA, Schenkman D, Brunner K, Capuano SV 3rd, Weinfurter JT, Kilander A, Dudman SG, Suresh M, Hungnes O, Friedrich TC, Kawaoka Y. Characterization in vitro and in vivo of pandemic (H1N1) 2009 viruses isolated from patients. *J Virol* 86:9361-9368, 2012.

Inagaki A, Goto H, Kakugawa S, Ozawa M, Kawaoka Y. Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions. *J Virol* 86:10200-10202, 2012.

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine* 30:6027-6033, 2012.

Kiso M, Ozawa M, Le MT, Imai H, Takahashi K, Kakugawa S, Noda T, Horimoto T, Kawaoka Y. Effect of an asparagine-to-serine mutation at position 294 in neuraminidase on the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *J Virol* 85:4667-4672, 2011.

Ozawa M, Victor ST, Taft AS, Yamada S, Li C, Hatta M, Das SC, Takashita E, Kakugawa S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. *J Gen Virol* 92:2879-2888, 2011.

Watanabe T, Shinya K, Watanabe S, Imai M, Hatta M, Li C, Wolter BF, Neumann G,

Hanson A, Ozawa M, Yamada S, Imai H, Sakabe S, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Ito M, Fukuyama S, Kawakami E, Gorai T, Simmons HA, Schenkman D, Brunner K, Capuano SV 3rd, Weinfurter JT, Nishio W, Maniwa Y, Igarashi T, Makino A, Travanty EA, Wang J, Kilander A, Dudman SG, Suresh M, Mason RJ, Hungnes O, Friedrich TC, Kawaoka Y. Avian-type receptor-binding ability can increase influenza virus pathogenicity in macaques. *J Virol* 85:13195-13203, 2011.

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Sero-prevalence of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol* 18:860-866, 2011.

Ozawa M, Basnet S, Burley LM, Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *J Virol* 85:4596-4601, 2011.

2. 学会発表

山地玲奈、山田晋弥、河岡義裕「H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応に関与するアミノ酸変異の同定」Third Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2014年1月

山地玲奈、山田晋弥、河岡義裕「H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応に関与するアミノ酸変異の同定」Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

—インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成モニタリングシステムの開発 および喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製—

分担研究者：長谷川 秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

協力研究者：川口 晶(国立感染症研究所 感染病理部 協力研究員)

鈴木 忠樹(国立感染症研究所 感染病理部 室長)

相内 章(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 主任研究官)

研究要旨： 高病原性の新型インフルエンザ発生に対応するために、適切な治療薬の開発が欠かせない。インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼはウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。そこで、蛍光タンパク質再構成 (BiFC) 法を用いてインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成をリアルタイムでモニタリングするシステムを構築した。このシステムは特異性の高いポリメラーゼの機能阻害薬のスクリーニングに有用であると考えられる。一方、このような治療薬の開発には動物モデルが必要不可欠である。そこで、2009 年の H1N1pdm09 による新型インフルエンザ発生時に重症化の基礎疾患として問題となった気管支喘息とインフルエンザウイルス感染との関係性を明らかにする新たな動物モデルの構築を試みた。一般的に呼吸器ウイルス感染症は気管支喘息の重大な増悪因子になると考えられており、喘息はインフルエンザの重症化因子である可能性が指摘されている。しかし、インフルエンザウイルス感染時の喘息発作の病態とその形成機序については不明な点が多い。そこで、喘息モデル動物を用いてインフルエンザウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響を解析する新たな動物モデルを開発した。今後、この動物モデルを用いて、気管支喘息を背景に持つ重症インフルエンザ患者の適切な治療法が開発されることが期待される。

A. 研究目的

1)インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成モニタリングシステムの開発

ウイルス RNA ポリメラーゼはインフルエンザウイルスの増殖過程の中で、ウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子転写に関わる重要な分子であり、この分子の機

能発現機構を理解する事は、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを標的とした治療薬開発に直接的につながる可能性が考えられる。

インフルエンザの RNA ポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。この三量体は、PB1 をコアとして

PA-PB1 結合、PB1-PB2 結合という二つの直接結合によって形成されている。これらの結合様式は、生化学的手法により解析が進んでおり、結合部位のみを結晶化することにより構造生物学的な解明も進んでいる。しかしながら、感染細胞内でのポリメラーゼ複合体の形成は、*in vitro* で見られるような二つの単純な直接結合が自律的に形成されることによって起こるのではなく、ウイルス複製の場である核内への能動輸送と密接に関わっていることが知られており、この過程においては、多くの宿主因子との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、我々は、この分子機構をリアルタイムでモニタリングできるシステムを開発するために蛍光タンパク質再構成法 (Bimolecular fluorescence complementation; BiFC) を用いて細胞内で RNA ポリメラーゼ複合体形成とポリメラーゼ複合体核内輸送を同時に定量的に評価できるシステムの構築を試みた。

2) 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製

上述のようなスクリーニングシステムを用いた治療薬開発の次のステップとして、薬剤効果を確認する適切な動物モデルが必要不可欠である。2009年の新型インフルエンザ(H1N1pdm09)では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向があったことが指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度に関わらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかになってきた。しかしながら、喘息患者でのインフルエンザ重症化の病因・病態については全く分かっていない。そこで、気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザウイルス感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明する新たな動物モデルの開発を目指した。本研究では気管支

喘息モデル動物として、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルであるNC/Ngaマウスを用いた。このマウスを用いたOVA感作気管支喘息モデルではBALB/cマウスに比べ血中IgEの上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことから、気管支喘息の良い疾患モデルとして知られている。そこで、このマウスを用いて喘息発作と感染との関係性を明らかにするために、ウイルス感染と喘息発作を組み合わせた動物モデルを作製し、病理学のおよび免疫学的に解析し、インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化の病態モデルの構築を試みた。

B. 研究方法

1) インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼ形成モニタリングシステムの開発

1-1) BiFC プラスミドの作製

BiFC プラスミドは鋳型 cDNA から PA、PB1、PB2 の配列を PCR 法により増幅し、pCXSIN ベクターにサブクローニングし、続いてポリメラーゼ配列の 3'領域に蛍光タンパク質 Venus の N 末側 1~173 アミノ酸をコードする配列もしくは C 末側 155~228 アミノ酸をコードする配列を挿入し作製した。ポリメラーゼと蛍光タンパク質 Venus の 間 に は NSR TKLGSA AANSADGGGGSGGSGGSGGGSTQGTGGS からなるリンカー配列を挿入した。PA、PB1、PB2 の鋳型 cDNA は高田礼人博士(北海道大学)からインフルエンザウイルス A/PuertoRico/8/34(H1N1) の cDNA を供与していただいた。作製したプラスミドは、全てシーケンスを確認した。

1-2) 細胞培養とトランスフェクション

培養細胞株としてヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞

株にSV40を形質転換させた293T細胞を用いた。細胞株は10% FBSおよび抗生物質を含んだDMEM培地で培養を行った。トランスフェクションは、FuGENE HD(Roche Diagnostics)を用いてメーカー推奨プロトコールに従い実施した。

1-3) フローサイトメトリー

96well plate に播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細胞を cell dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で分散させ、1,500 rpm、3 min、4°Cで遠心し、2 ml の 2% fetal bovine serum (FBS)含有 phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、1,500 rpm、3 分、4°Cで遠心し、400 μ の 2% paraformaldehyde (PFA) / 2% FBS 含有 PBS に懸濁した。処理した細胞はフローサイトメトリー (FACS CantoII, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて解析した。

1-4) 蛍光顕微鏡解析

35 mm グラスボトムディッシュに播き込んだ細胞に各種プラスミドをトランスフェクションし 48 時間培養した。その後、細胞を 3% PFA で固定した。固定後、4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色し、共焦点顕微鏡 FV1000D(オリンパス)もしくは冷却CCDカメラ(浜松フォトニクス)を備えた倒立蛍光顕微鏡で観察し、撮像した。得られた画像データはMetaMorphソフトウェア(Molecular device)で解析した。

1-5) Raster image correlation spectroscopy

RICS データ取得は、プラスミドをトランスフェクションした細胞を 37°Cに維持したインキュベーターチャンバー(東海ヒット)を備えた共焦点顕微鏡 FV1000D で行っ

た。油浸 60 倍(1.35 NA)の対物レンズ、励起レーザーは 515nm のアルゴンレーザーを用いた。スキャンスピードは 10.0 μ s/pixel、スキャンエリアは 256x256 の 100 フレームでデータを取得した。電子ズームは 16.4 倍としピクセルサイズを 50 nm とした。RICS データ解析は Fluoview1000 ソフトウェア(オリンパス)の RICS 解析パッケージを用いて行った。この条件での蛍光タンパク質 Venus の細胞質内での拡散係数は $25.1 \pm 7.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となり、他の手法で求められた値と矛盾しない。

2) 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製

2-1) 気管支喘息マウスを用いたインフルエンザウイルス感染実験

6~8 週齢の NC/Nga マウスまたは BALB/c マウスに卵白アルブミン(OVA) 100 μ g + alum 2mg / 200 μ l PBS を1週間間隔で 2 回腹腔内投与した。

感染後喘息発作モデルにおいては、OVA 最終投与から 1 週間後に Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。接種ウイルス量は、40 LD₅₀に相当する。Narita 株は BALB/c マウスの肺内にて 15 代継代しマウスに馴化させた株を用いた。対照群には、ウイルスを接種していない有精卵(10 日卵)の漿尿液を接種ウイルス液と同程度に希釈したものをを用いた。続いて気管支喘息発作を誘発するためにウイルス接種 1 日後と 2 日後に OVA 100 μ g / 20 μ l PBS を経鼻投与した。対照群には PBS のみを投与した。ウイルス接種 1 日後と 2 日後、および 3 日後(最後の OVA 経鼻投与から 24 時間後)にこれらの動物を過麻酔殺し、肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80°Cに保管した。また、

体重減少率の測定実験には、感染後21日目まで観察を行った。喘息発作後感染モデルにおいては、OVA 最終投与から1週間後に2日連続でOVA 100 μ g / 20 μ l PBS をケタラール／キシラジン麻酔下で経鼻接種した。最終のOVA 経鼻投与24時間後にInfluenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 4×10^4 PFU/20 μ l (Narita 株)でケタラール／キシラジン麻酔下で経鼻接種した。OVA 投与後1日後、2日後、4日後(それぞれウイルス感染0日後、1日後、3日後)に、これらの動物を過麻酔殺し肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80 $^{\circ}$ Cに保管した。また、体重減少率の測定実験には、感染後21日目まで観察を行った。これらの動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2-2) 肺洗浄液(BALF)細胞数計測

BALF 中の総細胞数を Vetscan を用いて計測した。各細胞種は BALF を CytoSpin 4 Cyto centrifuge (Thermo)を用いてガラス上に密着させギムザ染色およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、正立顕微鏡 BX43(オリンパス)を用いて計測した。

2-3) ケモカインの定量

BALF 中のケモカインは Mouse Cytokine 20-Plex Antibody Bead Kit (Invitrogen)を用いてプロトコールに従いサンプル処理を行い、LUMINEX システムにて計測を行った。

2-4) ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたブランクアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を 200 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C の培養器内で

1 時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37 $^{\circ}$ C で 40 時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、ブランク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

C. 研究結果

1) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ形成モニタリングシステムの開発

1-1) RNA ポリメラーゼを構成する PA—PB1 結合の可視化

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、PA、PB1、PB2 という3つのウイルスタンパク質で構成されるヘテロ三量体である。この三量体は、PB1 をコアとしてPA-PB1 結合、PB1-PB2 結合という二つの直接結合によって形成されている。まず始めに、PA-PB1 結合を可視化する BiFC プローブの作製を試みた。ポリメラーゼサブユニットの N 末側に何らかのタンパク質を融合するとポリメラーゼの機能が損なわれるという事が知られていることから、いずれのポリメラーゼも C 末側に蛍光タンパク質を融合した。作製した BiFC プラスミドを適切な組み合わせ(PA-VN と PB1-VC、PA-VC と PB1-VN)で 293T 細胞にトランスフェクションした所、Venus と同様の蛍光が観察された。フローサイトメーターで定量した所、BiFC プラスミドのいずれの組み合わせにおいても同程度の蛍光シグナルが検出された。また、このシグナルは蛍光タンパク質を融合していない PB2 の共発現の影響は受けなかった。次に、共焦点顕微鏡にて BiFC シグナルの細胞内局在を検討した所、PA-PB1 結合を示す BiFC シグナルは、核と細胞質のいずれにも認められた。しかしながら、PB2 を共発現させると、BiFC シグナルは核内のみ認められ、PA-PB1 複合体が核内に集積していると考えられた。