

## 「新型インフルエンザ対策に資する緊急研究」

実施予定期間：平成 21 年度

調査研究実施計画

代表者：渡邊 治雄（国立感染症研究所 副所長）

中核機関：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）

林崎 良英（（独）理化学研究所・オミックス基盤研究領域 領域長）

河岡 義裕（国立大学法人東京大学・医科学研究所 ウイルス感染分野 分野長）

### I. 調査研究の全体計画

#### 1. 調査研究の趣旨

新型インフルエンザ（2009 パンデミックインフルエンザ H1N1; H1N1 pdm）が 2 月以降メキシコを中心に発生し、その後世界的に広がり我が国でも 5 月以降に各地で小規模な流行が確認された。今秋以降には我が国でも各地で大流行する事が予想されている。

これに対応するために、現在、新型インフルエンザ（インフルエンザ A/H1N1sw1）についてこれまでに策定されている行動計画を踏まえて発生早期における水際対応、国内対応が進められているところである。しかし、当初想定されていたインフルエンザ H5N1 ウイルスとは異なることから対応方針の再調整が必要とされている。また、仮に現在の感染の拡大が一旦収束した場合であっても、今冬シーズンに想定される第 2 波に備えた十分な準備が喫緊の課題であり、それまでの約 6 ヶ月間に現在のウイルスを前提とした対策の実施に資する研究を緊急的に実施する必要がある。

#### a. 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 (H1N1pdm) の診断等の体制の構築に関する緊急研究

現在臨床現場等で使用されているイムノクロマト法による迅速診断法は、A 型または B 型インフルエンザウイルスの判定のみで、新型インフルエンザかの診断を行えない、PCR 法などの核酸検出法に比べて検出感度が低く偽陰性判定も多いなどの問題点がある。さらに、Real-timePCR 法も H1 用プライマーのみでは季節性インフルエンザ A/H1N1 と新型の A/H1N1pdm の鑑別が完全にできず、H1 (+) の場合に再度 pdm 検査を行う必要がある。

また、インフルエンザ A/H1N1pdm1 の感染の有無については、渡航歴等の行動履歴を踏まえ感染が疑われる者が同迅速診断法でインフルエンザ A (+) となった場合には、その者の検体を地方衛生研究

所又は国立感染症研究所に送付しそこで PCR 法により確定している。しかし、多数の感染者が予想される感染まん延時には、臨床現場（医療機関）で季節性インフルエンザかインフルエンザ A/H1N1pdm であるかの迅速診断が必要となる。新型インフルエンザの病原性がまだはっきりせず、基礎疾患をかかえた患者や妊婦にたいしてはハイリスクの可能性があることから必須である。

このため、既存の技術を最大限に応用して、医療機関で実施可能なインフルエンザ A/H1N1pdm の簡便で迅速かつ正確な診断法を早急に開発し、早期診断・早期治療開始が可能な体制整備を行う。今後、第 2 波に備えて約 6 ヶ月での開発、臨床現場での有用性（感度、簡便性、迅速性）の検証、実用化を目指す。また、PCR プライマーの改良、インフルエンザ A/H1N1pdm ウイルスの遺伝子変異の検出のために、ウイルスのゲノム情報の蓄積を進める。

#### b. 新型インフルエンザの国内発生状況の早期把握と迅速な国内対応の決定に関する緊急研究

今回のパンデミックの経過中、罹患する年齢層および重症例が若年層に偏っていることや多くの患者が軽症であったことから、過去のインフルエンザ流行によって獲得された免疫がこの新型ウイルスに対して、なんらかの防御効果があるのではないかと考えられている。このため、国民がこの新型と考えられるインフルエンザウイルスに対してどのくらい免疫をもっているかを把握することが、今後の流行を予想し予防接種の優先順位を考える上でも必要と考えられる。

今回は幸いにインフルエンザ症状をきたした患者のほとんどがインフルエンザ (H1N1) 2009 であった。しかし、冬季に入り季節性インフルエンザの流行期には新型と季節性が混在することが考えられ、その状況下では地方衛生研究所を中心とした現状のサーベイランスのみで正確な情報が得られるかが不明である。

さらに、新型インフルエンザと言う名称が付けられているものの、ほとんどの患者が軽症で、小児を除いて重症化しているのは一部の一定のリスクのある方が多いことが示唆されている。これらの情報は文書やインターネット経由で提供されているものの十分には伝わっていないといった指摘もあり、正確な情報を適切に伝えてゆく必要がある。

そこで、パンデミックは進行中であるため、国立感染症研究所で管理・維持している血清バンク保管血清を利用して、国民の抗体保有状況を調べて予防接種対象者の考え方の資料として提供する。また、現状の病原体サーベイランスについて評価を行い、正確な状況を把握するために必要な検体数を算出し、それらをもとに、今後の病原体サーベイランスのあり方について提言を作成する。さらに、基本的に読まれることを期待した情報提供に加えて、ウェブキャストの動画による情報提供の試みを行う。

## 2. 調査研究の概要

### a. 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 (H1N1pdm) の診断等の体制の構築に関する緊急研究

#### (1) 医療機関において実施可能な診断系を確立する

##### (a) インフルエンザ A/H1N1pdm の迅速 DNA 検出系の開発

複数の検出系について並行して研究開発し、早急に感度、実用性等の評価を行い、臨床現場で使用できる簡易・迅速診断系の実用化を目指す。

インフルエンザ A/H1N1pdm 特異的 RT-LAMP 法の開発では、M 遺伝子用の A 型共通プライマー、新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) HA 遺伝子特異的プライマーを設計し、新型インフルエンザウイルスを含む様々の亜型インフルエンザウイルスの特異的な検出、感度の確認を行い、新型インフルエンザウイルスの検出系の構築を行う。次に、病院で採取された臨床検体を用いて、構築した検出系の評価を行い、新型インフルエンザウイルスを正確に検出できるかどうかを判断する。

新型インフルエンザウイルス検出のための scFv を用いたイムノクロマトグラフィおよびハイブリッドクロマトグラフィの開発では、ナイーブファージディスプレイライブラリーを用いた新型インフルエンザウイルス特異的なヒト抗体遺伝子 (scFv) をスクリーニングし、それを用いてベッドサイドで利用可能なイムノクロマト法による抗原検出系を構築する。さらに、薄相クロマトグラフィ法と核酸ハイブリダイゼーション法を組合せたウイルス遺伝子タイピング法の開発を試み、患者の鼻腔又は咽頭ぬぐい液を用いたインフルエンザウイルスの直接タイピング系の構築を目指す。

Hyper-PCR 法の応用では、トラスト株式会社と新たに共同開発した迅速な Hyper-PCR 法の技術をインフルエンザ A/H1N1sw1 の迅速診断に適用して検査時間の短縮を図る。

非対称 RT-PCR 核酸クロマト法を用いた新型インフルエンザ A/H1N1pdm 簡便検出法の開発では、ばらつきが少なく判定しやすく汎用性がある検出法を開発する。ビオチン化プライマーと非ビオチン化プライマーを用いた非対称 PCR 反応により熱変性等をすることなく核酸クロマト法により目視検出が可能な検出系の構築をめざす。

##### (b) 抗原抗体反応を用いたウイルス型特異的抗原検出系の開発

インフルエンザ抗原に対する抗体を用いて臨床サンプル中のウイルスを迅速に検出する系を作製し、ベットサイドで簡便に利用できる方法を目指す。

無細胞系を用いてのインフルエンザ抗原の作成では、小麦胚芽抽出無細胞タンパク質合成系を用いてインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルスタンパク質を遺伝子より直接合成し、それを用いて ELISA 法の確立、抗体作成を行う。

マウスモノクローナル抗体を利用した免疫クロマトグラフィ法の開発では、新型インフルエンザウイルスと季節性インフルエンザウイルスを別々に検出することが可能な新規マウスモノクローナル抗体を作製し、両者の識別が不可能な現行の免疫迅速診断の問題点を解決する。十分な特異性と感度が得られた抗体に関しては、メーカーとの共同開発により、実用化につなげる予定である。

A(H1N1) 新型インフルエンザ迅速診断に資するポリペプチド抗体の作成では、A(H1N1) 新型インフルエンザ HA と従来の季節性インフルエンザ HA で異なる 11 アミノ酸に対して、それぞれに特異的なモノクローナル抗体の作製を試みる。

A/H1N1pdm 特異的イムノクロマト及び血清エライザ作成に向けた抗原発現系構築と抗原精製では、A/H1N1pdm を迅速に識別するイムノクロマトおよび血清疫学用エライザのための抗体および抗原の供給を行う。抗原は糖鎖の修飾等を考慮し哺乳動物細胞を用いた発現系を用いて調整し、季節性インフルエンザに対する抗体を用いて反応性について確認する。加えて、本免疫組織学的手法に用いることが可能な抗体についても明らかにする。

A/H1N1pdm 感染既往のある者から新型インフルエンザ感染の検査・診断用抗体クローンの作出では、A/H1N1pdm 感染既往のある健康なボランティアから A/H1N1pdm を認識するヒト抗体クローンをハイブリドーマ法により分離し、これを迅速検査・診断法の開発に提供する。

検査技師が実施可能な迅速診断キット (ELISA 法) の約 6 ヶ月での実用化およびその臨床評価では、ヒト型 (季節型) インフルエンザ流行期までに臨床現場での実用化を視野に、ヒト型 (季節型)

インフルエンザ H1N1 及び H3N2、豚型インフルエンザ H1N1、さらには高病原性鳥型インフルエンザ H5N1 のそれぞれ特徴的な配列の構成蛋白質に対する抗体を作成する。それぞれに特異的な ELISA キットを作成し、ヒト型（季節型）インフルエンザ H1N1 についてはその臨床現場での実用性の検証まで行う。さらに、迅速診断キット（イムノクロマト法）の試作を行い、臨床検体を用いて従来法、ELISA 法との比較検討を行う。これから、将来実用化の上での問題点などを洗い出す。

### (c) インフルエンザ A/H1N1sw1 ウイルスの経時的ゲノム解析

国内で発生するインフルエンザ A/H1N1sw1 のゲノム全長情報を収集し、その変異を経時的に追跡して進化系統、多様性、分子構造の変化を追跡することにより、遺伝子変異、病原性変化の予測を試みる。また、情報エントロピー解析によるゲノム及び蛋白質の変異部位、ゲノムと蛋白質の経時変化、およびヒト流行で定着する可能性のある変異などの推定、変異による立体構造、抗原性の変化の推定も行う。H1N1sw1 の検出効率、表現型（抗原性、薬剤感受性など）の変化に結びつく可能性のある変異を特定した場合は関係者に情報を提供する予定。

## (2) 医療機関における早期診断法の活用方策等の検討

各研究グループが複数のアプローチにより新規に開発した A/H1pdm 迅速診断法（抗原抗体反応を用いた検出系、ウイルス遺伝子検出系）の有用性を、当センターを受診するインフルエンザ様症状を呈した患者を対象として患者由来の臨床検体を用いた臨床試験で検討する。

それぞれの臨床試験につき必要となる倫理委員会審査にて承認を受けたのち、当センターを受診した患者のうちインフルエンザ様症状を呈したものに対しインフォームドコンセントを得て、新規診断法により患者検体を用いた判定を行う。これらの結果を標準診断判定法である RT-PCR 法やウイルス分離培養の結果と比較し、新規診断法の有用性（感度、簡便性、迅速性）を検証する。また、これらの新規診断法による診断に基づき、当該患者に適切な治療を提供して、その効果（死亡率、入院期間、発症から治療開始までに要した時間など）を検討する。

## (3) 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 の診断等の体制の構築に関する緊急研究

### (a) 新型インフルエンザウイルスの解析

新型インフルエンザウイルスを収集してそれら

の塩基配列を解析する。この結果をもとに、（独）理化学研究所が開発した Smart Amp 法による迅速診断キット開発に適したプライマー配列の選択を行う。

### (b) 迅速診断キットの開発、評価

(a) をもとに、新型インフルエンザウイルスと季節性インフルエンザウイルスを迅速に鑑別診断できるキットを作製し、現在流行している新型インフルエンザ（H1N1）、季節性インフルエンザソ連型（H1N1）、季節性インフルエンザ香港型（H3N2）、鳥インフルエンザ（H5N1）を用いて評価する。さらに、臨床機関の協力を得て、臨床現場での有効性を検証する。

## b. 新型インフルエンザの国内発生状況の早期把握と迅速な国内対応の決定に関する緊急研究

### (1) 国民のインフルエンザ（H1N1）2009 に対する血清学的免疫性の検証

国立感染症研究所において管理している血清バンクで保存されている過去 30 年にわたる全年齢層の血清を用い、年齢別のインフルエンザ（H1N1）2009 に対する抗体反応を検討する。血清バンクからの血清使用申請を行い、年齢群別にランダムに抽出した年齢群別血清を用いて、現在のインフルエンザウイルス（H1N1）2009 を用いて、中和抗体価および赤血球凝集抑制抗体価を測定する。

### (2) インフルエンザ（H1N1）2009 ウイルスサーベイランス体制の構築

これまで年間 5,000~8,000 のウイルスがサーベイランスのために分離され、それらの型と亜型が判定され、それらの抗原性が解析されて、流行ウイルスの状況が把握されているが、過去のデータを考えて、新型ウイルスのなかに、どのくらいの頻度で季節性ウイルスが混合流行した際に探知できるかを検討し、このために必要な検体数を検討する。これを踏まえて、今後の病原体サーベイランスの方法について提言を作成する。

### (3) ワクチン接種推奨のあり方を含む、国民への情報発信、リスクコミュニケーション確保の方法

感染症情報センターでは、継続的にメディア、講演、インターネットを通して情報提供が行われているが、これまでの情報提供体制を検討し、現在どのような情報を提供すべきかを設定した後、情報発信に必要なメディアの検討を行い、実際の情報提供メディアの開発を行う。

### 3. 年次計画

調査研究項目	平成 21 年度
<b>a. 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 (H1N1 pdm) の診断等の体制の構築に関する緊急研究</b>	
<p><b>(1) 医療機関において実施可能な診断系の確立等</b></p> <p>(a) インフルエンザ A/H1N1pdm の迅速 DNA 検出系の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ インフルエンザ A/H1N1pdm 特異的 RT-LAMP 法の開発</li> <li>・ 新型インフルエンザウイルス検出のための scFv を用いたイムノクロマトグラフィーおよびハイブリッドクロマトグラフィーの開発</li> <li>・ Hyper-PCR 法の応用</li> <li>・ 非対称 RT-PCR 核酸クロマト法を用いた新型インフルエンザ A/H1N1pdm 簡便検出法の開発</li> </ul> <p>(b) 抗原抗体反応を用いたウイルス型特異的抗原検出系の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 無細胞系を用いたインフルエンザ抗原の作成</li> <li>・ マウスモノクローナル抗体を利用した免疫クロマトグラフィー法の開発</li> <li>・ A(H1N1) 新型インフルエンザ迅速診断に資するポリペプチド抗体の作成</li> <li>・ A/H1N1pdm 特異的イムノクロマト及び血清エライザ作成に向けた抗原発現系構築と抗原精製</li> <li>・ A/H1N1pdm 感染既往のある者から新型インフルエンザ感染の検査・診断用抗体クローンの作出・検査技師が実施可能な迅速診断キット (ELISA 法) の約 6 ヶ月での実用化およびその臨床評価</li> </ul> <p>(c) インフルエンザ A/H1N1sw1 ウイルスの経時的ゲノム解析</p> <p><b>(2) 医療機関における早期診断法の活用方策等の検討</b></p> <p><b>(3) 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 の診断等の体制の構築に関する緊急研究</b></p> <p>(a) 新型インフルエンザウイルスの解析</p> <p>(b) 迅速診断キットの開発、評価</p>	
所要経費 (合計)	8 1 . 8 百万円
<b>b. 新型インフルエンザの国内発生状況の早期把握と迅速な国内対応の決定に関する緊急研究</b>	
<p><b>(1) 国民のインフルエンザ (H1N1) 2009 に対する血清学的免疫性の検証</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 検体の選定, 抗体価測定及び解析とまとめ</li> </ul> <p><b>(2) インフルエンザ (H1N1) 2009 ウイルスサーベイランス体制の構築</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 現状の検討と解析と提言案作成</li> </ul> <p><b>(3) ワクチン接種推奨のあり方を含む、国民への情報発信、リスクコミュニケーション確保の方法</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 現状の検討及びマテリアルの作成と試行</li> </ul>	
所要経費 (合計)	7 . 6 百万円

## II. 今年度における実施体制

調査研究項目	担当機関	担当者
<b>a. 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 (H1N1 pdm) の診断等の体制の構築に関する緊急研究</b>		
<b>(1) 医療機関において実施可能な診断系の確立等</b>	厚生労働省国立感染症研究所	
(a) インフルエンザ A/H1N1pdm の迅速 DNA 検出系の開発 ・ インフルエンザ A/H1N1pdm 特異的 RT-LAMP 法の開発 ・ 新型インフルエンザウイルス検出のための scFv を用いたイムノクロマトグラフィーおよびハイブリッドクロマトグラフィーの開発 ・ Hyper-PCR 法の応用 ・ 非対称 RT-PCR 核酸クロマト法を用いた新型インフルエンザ A/H1N1pdm 簡便検出法の開発	同上インフルエンザウイルス研究センター 同上獣医科学部 同上感染症情報センター 同上血液・安全性研究部	○ 影山努 ◎ 田代真人 ○ 加来義浩 宇田晶彦 ◎ 山田章雄 ◎ 藤本嗣人 ○ 野島清子 ◎ 浜口 功
(b) 抗原抗体反応を用いたウイルス型特異的抗原検出系の開発 ・ 無細胞系を用いてのインフルエンザ抗原の作成 ・ マウスモノクローナル抗体を利用した免疫クロマトグラフィー法の開発 ・ A(H1N1) 新型インフルエンザ迅速診断に資するポリペプチド抗体の作成 ・ A/H1N1pdm 特異的イムノクロマト及び血清エライザ作成に向けた抗原発現系構築と抗原精製 ・ A/H1N1pdm 感染既往のある者から新型インフルエンザ感染の検査・診断用抗体クローンの作出 ・ 検査技師が実施可能な迅速診断キット (ELISA 法) の約 6 ヶ月での実用化およびその臨床評価	同上細菌第一部 同上免疫部同上細胞化学部 同上感染病理部 同上エイズ研究センター 国立国際医療センター	◎ 大西 真 ○ 高橋宜聖 ◎ 小林 和夫 ◎ 花田賢太 ○ 飛梅 実 ◎ 佐多徹太郎 ○ 駒野 淳 ◎ 山本直樹 ○ 秋山 徹 河内正治 ◎ 切替照雄
(c) インフルエンザ A/H1N1sw1 ウイルスの経時的ゲノム解析	国立感染症研究所	
	感染症情報センター 病原体ゲノム解析研究センター	◎ 椎野禎一郎 ○ 佐藤裕徳 横山勝 ◎ 神田忠仁
<b>(2) 医療機関における早期診断法の活用方策等の検討</b>	国立国際医療センター	
		◎ 工藤宏一郎 ○ 泉 信有
<b>(3) 臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1sw1 の診断等の体制の構築に関する緊急研究</b>	国立大学法人東京大学	
(a) 新型インフルエンザウイルスの解析		◎ 河岡義裕 ○ 堀本泰介 坂井 (田川) 優子 五藤秀男 下島昌幸
(b) 迅速診断キットの開発、評価	(独) 理化学研究所	◎ 林崎良英

b. 新型インフルエンザの国内発生状況の早期把握と迅速な国内対応の決定に関する緊急研究		
<p>(1) インフルエンザ (H1N1) 2009 に対する血清学的免疫性の検証</p> <p>・ 抗体の選定、抗体価測定及び解析とりまとめ</p>	厚生労働省国立感染症研究所 感染症情報センター	○ 多屋馨子 ◎ 岡部信彦
<p>(2) インフルエンザ (H1N1) 2009 ウイルスサーベイランス体制の構築</p> <p>・ 検討と解析と提言案作成</p>	厚生労働省国立感染症研 究所感染症情報センター	○ 谷口清州 ◎ 岡部信彦
<p>(3) ワクチン接種推奨のあり方を含む、国民への情報発信、リスクコ ミュニケーション確保の方法</p> <p>・ 検討とマテリアル作成及びまとめ</p>	厚生労働省国立感染症研 究所感染症情報センター	○ 新井智 ◎ 岡部信彦

(注：◎は代表者、○はサブテーマ責任者)