

## 鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型 同定法の確立

亜型不明のインフルエンザウイルスについて、迅速かつ確実に亜型同定が行えるように、1 日以内に亜型同定を行う事が可能なシーケンス法を用いた遺伝子解析法の確立を目的とし、本研究を遂行した。

## 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系 の構築ならびに国内検査体制の整備

平成 25 年 3 月 31 日に中国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのヒトへの初感染例が報告された。その後 8 月までに 135 例の症例が報告されたが、4、5 月をピークに症例数は減り、9 月には 0 となった。しかし、10 月になり再び感染例が報告されるようになると、平成 25 年 10 月から平成 26 年 2 月までの間に、230 例以上の症例が報告されるようになった。症例報告のあった感染者の多くは急性呼吸促迫症候群(ARDS)を発症し死亡例も多い。台湾やマレーシアでは中国からの輸入感染例が報告されており、日本でも感染者が発見される可能性がある。

平成 25 年 6 月 7 日に改定された「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」では、新型インフルエンザが海外で発生した場合に、国内発生に備えてサーベイランス体制を強化する事が対策の一つとなっており、「国立感染症研究所において、新型インフルエンザ等に対する PCR 等の検査体制を確立する。」とも明示されている。

本研究では、全国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの核酸検出検査を可能にするため、real-time RT-PCR 法を利用した検出系の構築と全国地方衛生研究所ならびに検疫所での検査体制の整備を行ったので報告する。

## B. 研究方法

## 薬剤耐性株の検出系について

以前に構築したreal-time RT-PCR法による 275H、275Y、275H/275Y Mix株の検出系のプローブ配列に変更を加え、臨床検体および分離株中の275Hと275Yの構成割合をより正確に判定できるよう改良を行った。この検出系を用いて、臨床検体ならびに培養細胞によるウイルス分離培養液中の275Hと275Yの構成割合を求めた。結果をもとに、培養細胞でウイルス分離や継代をする際に275Hと275Yの構成割合に変化がないか検討を行った。

## ブタ由来A/H3亜型インフルエンザウイルス 検出法の構築

過去5年間にヒトで流行したA/H3亜型インフルエンザウイルスおよび近年北米大陸でブタから分離されたA/H3亜型インフルエンザウイルスのHA遺伝子配列のアライメントを作成し、共通領域に増幅用プライマーを設計し、それぞれの特異的領域にヒトおよびブタインフルエンザウイルスを識別できるプローブを設計した。米国CDCより分与されたブタ由来のA/H3亜型インフルエンザウイルス (A/Indiana/10/2011) および近年日本で流行しているヒト由来A/H3亜型インフルエンザウイルスからRNAを抽出し、それを鋳型に構築した検出系の感度および特異性の検討を行った。また、これまで当センターで構築したA型インフルエンザウイルスを特異的に検出するreal-time RT-PCR検出系(検出感度7.5 copies/reaction)との感度比較を行った。

## 鳥由来A型インフルエンザウイルスの亜型 同定法の確立

ウイルスRNAからのcDNA作製は、Uni12プライマーを利用し、Super Script III逆転写酵素(Invitrogen)を用いた逆転写反応により行った。HA遺伝子ならびにNA遺伝子全長

の増幅に使用するPCRプライマーについては、より確実に遺伝子増幅が行えるように、既存の配列（E. Hoffmannら Arch Virol 146: 2275-89, 2001）の改変を試みた。遺伝子増幅反応は反応中により変異が入りにくい Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES)を用いた。

HAおよびNA亜型の同定に必要なシークエンスプライマーは、全亜型の鳥由来分離株について、それぞれ最新のものから10～350株程度のHA遺伝子およびNA遺伝子配列のアライメントを作成し、亜型間で比較的保存されている領域を見出し、その領域内に遺伝子配列の解読に必要なシークエンスプライマーを設計した。

当センターのインフルエンザウイルスライブラリーに保管してあるインフルエンザウイルスを用いて、本亜型同定法の検証を行った。また、2012年11月と12月に福岡県で新たに鳥から分離された計5株のA型インフルエンザウイルスについて、本方法を用いた遺伝子解析およびBlast検索による亜型同定を迅速に行えるかどうかの評価を行った。

#### 鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の構築ならびに国内検査体制の整備

中国で初感染事例の報告と同時に鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの全長シークエンスが公開された。このシークエンスを元に、real-time RT-PCR法を利用した鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の構築を試みた。中国で分離された鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスを入手するまでには時間を要することから、新型インフルエンザウイルス系統調査・保存事業で当センターに集められたウイルスライブラリーの中から、real-time RT-PCR法を利用した鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の陽性コントロールとして使用可能かどうか、国

内で分離された3株のH7亜型鳥インフルエンザウイルスを選んで塩基配列の解読およびHA遺伝子配列を比較した相同性の解析を行った。その結果、A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7)が、中国で分離されたH7N9ウイルスのHA遺伝子配列と相同性もっとも高い事が判明し、このウイルスを陽性コントロールに利用できるreal-time RT-PCR法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出系の構築を進めた。

Real-time RT-PCR 検出系の構築にあたっては、データベースから入手可能なユーラシア系統 H7 亜型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列に対するアライメントを作成し、H7 亜型内で保存されている領域をターゲットとしたプライマーおよびプローブの設計を行った。

設計した検出系の検出感度、特異性などについての検討は、A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7)ウイルスより抽出した RNA を使用し、非特異的反応について評価検討は、他の亜型・型のインフルエンザウイルスならびに各種呼吸器感染症ウイルスから抽出した核酸を用いた。最終的に検出感度、特異性などの評価確認については、平成 25 年 4 月 10 日に中国 CDC より入手した A/Anhui/1/2013(H7N9)ウイルスから抽出した RNA を用いて検討した。

一方、検査で使用する陽性コントロールは、A/duck/Fukui/1/2004 ウイルス RNA の M 遺伝子の濃度を  $1.8 \times 10^7$  copies/tube に調整してキャリア RNA を加えた上で、凍結真空乾燥を行い、乾燥時の劣化がないことを確認してから、全国の地方衛生研究所および検疫所へ配布した。

(倫理面への配慮)

該当なし

#### C. 研究結果

### 薬剤耐性株の検出系について

従来の検出系では、プローブ配列の 5' 末端の塩基置換を識別する事により H275Y 変異の検出を行っていたが、今回の検出系では、プローブ中央の塩基置換を識別する事により H275Y 変異をより高感度に検出できるように変更した。また、real-time RT-PCR の反応条件については、増幅サイクル数を 35 に減らした。以上の変更により、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$  copies/reaction の範囲のウイルス RNA について 275H と 275Y の構成割合を判定する事のできる検出系を構築した。さらに高感度な検出系であるため、抽出した RNA を用いる事により臨床分離株だけではなく臨床検体の検査にも使用可能となった。また、この系の 275H と 275Y の構成割合の誤差範囲は  $\pm 5\%$  以内であり、簡潔かつ高精度に 275H と 275Y の構成割合を判定できる系であることが示された。

従来の検出系により 275H と 275Y の Mix である事が確認できた 1 例の臨床検体ならびにこの臨床検体由来の MDCK 細胞を用いた細胞分離株について、今回構築した系を使用して、275H と 275Y の構成割合を判定した。その結果、臨床検体では 40~60% 275Y、細胞分離株では 60~80% 275Y となった。また、この細胞分離株を MDCK 細胞で 5 代継代したところ、さらに 20% 程度 275Y の割合が増える傾向が示された。また、別の 1 例の臨床検体ならびにこの臨床検体由来の MDCK 細胞を用いた細胞分離株について、構成割合を判定した結果、臨床検体では 60~80% 275Y、細胞分離株では 100% となった。

### ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出法の構築

設計したブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プローブは A/Indiana/10/2011 ウイルス RNA を特異的に

検出し、ヒト由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プローブはヒトから分離されたウイルス由来 RNA を特異的に検出し、双方で交差反応性は見られなかった。また、現在ヒトで流行している A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス由来 RNA との交差反応性も見られなかった。A 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する real-time RT-PCR 検出系 (検出感度 7.5 copies/reaction) との感度比較を行ったところ、検出感度は同程度であった。今回、設計した共通プライマー配列 s-hH3 F2 および s-hH3 R2 と特異的プローブ s-hH3 P2 sw (ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用) と s-hH3 P2 hu (ヒト由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用) の配列は以下の通りである。  
s-hH3 F2 : AGCCAACAARCTGTAATYCCG AATATCG、s-hH3 R2 : CCCTGTGCTGTTA ATCAAAAGTATGTC、s-hH3 P2 sw : FAM-GTAAGGGGTGTCTCCAGCATA -MGB、s-hH3 P2 hu : VIC- GTAAGGAATATCCCTAGC AGARTAAG -MGB

### 鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法の確立

HA 遺伝子全長増幅用には、全亜型に共通の PCR プライマーを 1 組、NA 遺伝子全長増幅用には、N1、N2、N4、N5、N8 亜型共通の PCR プライマー 1 組に加え、N3 用、N6 用、N7 用、N9 用の計 5 組の PCR プライマーを既存配列より改変し、以下のプライマー配列を新たに設計して各遺伝子増幅に使用した。

5+HA-1 : CAGGGAGCAAAAGCAGGGG、  
11+NS-890R : CGTCTCGTATTAGTAGAAA CAAGGGTGT TTTT (HA 遺伝子用)、  
7+NA-1: CTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT、  
12+NA-1413R : TGGTCTCGTATTAGTAGA AACAAGGAGTTTTTTT (N1、N2、N4、N5、

N8 用)、5+N3-1 : CAGGGAGCAAAGCAG GTGC、11+N3-1420R : CGTCTCGTATTAGT AGAAACAAGGTGCTTTTT (N3 用)、 N6-1 : AGCAAAGCAGGGTGAAAATG、 11+NS-890R : CGTCTCGTATTAGTAGAAA CAAGGGTGT TTT (N6 用)、N7-1 : AGCAA AAGCAGGGTGATTGAGAATG、 11+NS-890R (N7 用)、5+N9-1 : CAGGGAG CAAAAGCAGGGTC、12+N9-1473R : TCGT CTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTCT (N9 用)

NA 遺伝子については、上記 5 組のプライマーによる PCR 産物のうち増幅が見られたものをシーケンス反応でのテンプレートとする事とした。

シーケンス用プライマーは、HA 遺伝子に対しては、各亜型 1 つ以上のプライマーが反応するように以下の 10 種類を設計し、シーケンス反応に用いた。NA 遺伝子に対しては、全亜型間で共通の以下の 1 種類を設計し、シーケンス反応に用いた。

(HA 遺伝子用) AHA-548F : GGRGKAGC KCTGCATGCM、AHA-652F : AASACYTAC ARCAAYAC、AHA7-680F : CCAGCTYTKA TAATWTGGGG、AHA-695F : TGGGGWR TKCACCATCCT、AHA9-695F : GTGGGGY ATAMAYCAYCC、AHA-701F : GTGCAYC ACCCTYC RAC、AHA-1242R : CCGTACCA ACCATYWAYCA、AHA7-1242R : CCRTAC CAYCCRTCAATYA、AHA9-1242R : CCRT ACCARCCWGCRA YTA、AHA-1480R : GAT STATGGWCATAYAATGC、(NA 遺伝子用) ANA943R-1 : CCIKCCARTTRTCYCTRCA

シーケンス反応には、上記のシーケンスプライマー以外にも PCR プライマーを使用し、AMpure XP (Beckman Coulter) により精製した PCR 産物をテンプレートに用いて、定法によりシーケンス反応およびシーケンス反応産物の精製を行い、Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer を用

いてシーケンス解析を行った。

インフルエンザウイルスライブラリーに保管してあるインフルエンザウイルスを用いて、本方法により HA および NA の各亜型同定が行える事を確認した。また、新たに鳥から分離された計 5 株の亜型不明の A 型インフルエンザウイルスについて、本方法を用いた亜型同定を試みた。HA 遺伝子および NA 遺伝子全長を増幅させるための PCR 反応を行った結果、NA 遺伝子については、全ての株で N1、N2、N4、N5、N8 亜型共通の PCR プライマーで増幅が見られた。HA および NA の PCR 増幅産物をテンプレートとしたシーケンス反応においては、HA 遺伝子については、各株 2~4 種類のプライマーが、NA 遺伝子については、全ての株で 3 種類のプライマーが反応した。得られた配列を元に Blast 解析を行い、一兩日以内に、2 株は H4N1 亜型、3 株は H1N1 亜型と同定する事ができた。

#### 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築ならびに国内検査体制の整備

今回構築したユーラシア系統 H7 亜型 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブの配列は、次の通りである。

Forward primer : TGTGATGAYGAYTYGAT GGCCAG、Reverse primer : ACATGATGCC CCGAAGCTAAAC、Probe : (FAM)ATCTGT ATTCTATTTTGCATTGCYTC(MGB)

検出感度の検討を行ったところ、本検出系は検出限界が数 copies/reaction であり非常に高感度だった。また、H7 亜型以外の型・亜型のインフルエンザウイルスから抽出した RNA および他の呼吸器系ウイルスから抽出した核酸を使用して、特異性および非特異反応について確認を行ったところ、H7 亜型以外の型・亜型および他のウイルスに対する交差反応は見られず、本検出系は特異性が高いことが示された。

4月12日に当所より全国74カ所の地方衛生研究所および16カ所の検疫所へ陽性コントロールを送付した。また、4月15日に試薬メーカーから遺伝子検査用試薬、プライマー、プローブを直送し、遅くとも翌日には全国の地方衛生研究所および検疫所への検査キット配布を完了した。また、同日「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第1版)」を地方衛生研究所へメールリングリストにて送付した。これにより全国で鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスの核酸検出検査を実施できる体制が整備された。

その後も、遺伝子検査時に陽性コントロール由来のコンタミネーションを区別できる陽性コントロールを作製して再配布を行うなど更なる検査体制の強化を行った。

また、4月12日に WHO GISRS (Global Influenza Surveillance and Response System) に今回構築した H7 亜型検出法プロトコルを情報共有し、検査キット配布希望のあった6カ所の National Influenza Center には遺伝子検査用試薬、プライマー、プローブ、陽性コントロールを送付した。(添付資料1)

#### D. 考察

##### 薬剤耐性株の検出系について

本検出系により、A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルス中の 275H と 275Y の構成割合を求めることが可能となった。この方法は、Pyrosequencing 法に比べ、より早く、安価に行うことができる利点がある。また、目視により散布図から一度に多検体の結果を判定することができ、解析も容易に行うことができることから、患者の体内での耐性株の出現を継続的にモニタリングする等の利用方法が期待できる。

また、今回の臨床検体ならびにその分離株を使用した結果から、培養細胞を使用して分離をするとウイルス中の 275H と 275Y

の構成割合が変化し、患者の体内でのそれらの構成割合と異なる可能性が示され、分離したウイルスの構成割合は臨床検体中に含まれているウイルスの構成割合を必ずしも反映しているとは限らない事が示された。

##### ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出法の構築

今回構築した検出系は高感度また特異的にブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルスを検出でき、このウイルスが日本へ侵入した際は、本検出系を全国の地方衛生研究所と検疫所に備えることで、全国レベルでの検査対応も可能になると考えられた。

##### 鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法の確立

従来から行ってきた HI および NI 試験法では、ウイルスの抗原変異の影響を受け、非特異反応や反応性低下などにより、亜型を正しく同定する事ができない事もあった。また、コンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法を用いた亜型同定法は、インフルエンザウイルスのように非常に多くの亜型がある上、同一亜型内でも多様性がある遺伝子配列をターゲットとする場合は、亜型別の検出系の維持ならびに同一亜型を幅広く検出できる検査系を構築する事は難しい。また、インフルエンザウイルスは、遺伝子変異の頻度が高く、検査系の更新を頻繁に行わなければならない、RT-PCR 法による全亜型を対象とした亜型同定を行う事は難しいと考えられる。本研究で確立したシーケンス解析による亜型同定法により、A 型インフルエンザウイルスの亜型同定は1日以内で確実に行うことが可能となった。

##### 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築ならびに国内検査体制の整備

海外で新型インフルエンザが発生した際には、国内でもすぐに流行する事が想定されるため、全国規模の遺伝子検査体制を迅速に整備する必要がある。

今回、中国で分離された鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスを入手する前に、当センターのウイルスライブラリーから検査で必要となる陽性コントロールに使用可能なウイルス株を見つける事ができたため、速やかに real-time RT-PCR 検出系を構築する事ができ、また検査キットの全国配布の際に、この陽性コントロールを使用する事ができた。このことから、今後、「新型インフルエンザウイルス系統調査・保存事業」や「感染症流行予測事業」による鳥およびブタインフルエンザウイルスのライブラリーの拡充は、わが国の新型インフルエンザ対策において非常に重要である。

## E. 結論

### 薬剤耐性株の検出系について

インフルエンザウイルスは抗インフルエンザウイルス剤であるオセルタミビルの使用により 275Y 変異を有した耐性株が体内で出現する場合がある。この時、臨床検体から検出されるウイルスは完全に耐性株に置き換わってしまった場合と感受性株と耐性株が混在する場合は考えられ、コミュニティでの耐性株の流行の広がりをモニタリングする上でも、これら混在比を調べる事ができる本検出系は非常に有用となる。また、患者体内での耐性株の出現を継続的にモニタリングする等の利用方法も期待でき、免疫不全症など長期にインフルエンザ罹患する可能性のある患者に対して、オセルタミビルの効果を推定する事が可能になると考えられる。また、臨床検体中と細胞分離株で混在比が大きく異なるケースもあり、耐性株の性状解析や耐性株出現機序の解明が今後は重要な課題となる。

### ブタ由来 A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出法の構築

全国の地方衛生研究所および検疫所に試薬を配布すれば、全国規模での検査態勢の構築が可能となる。今後は、どこの施設でも同じ精度・特異性・感度で検出できるようにするため、検査精度の管理が重要である。外部精度管理あるいは研修などを行い、各施設の検査精度を上げ、それを維持する事がパンデミック対策にも重要と考えられる。

### 鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法の確立

シーケンス法を用いた亜型同定法においては、HA および NA 遺伝子全長の増幅に用いる PCR プライマーは、全ての A 型インフルエンザウイルスの全遺伝子で共通に保存されている 5' および 3' 末端の塩基配列をターゲットとしているため、抗原変異に伴う遺伝子変異の影響を受けず、PCR プライマーの配列を更新する必要がほとんどない。また、シーケンスプライマーも相同性の高い領域に、PCR 産物に対して特異的に反応するように設計しており、また使用するプライマー数も最小限にとどめたため、従来よりも少ない反応数でシーケンス解析を行う事ができるようになり、より確実かつ短時間に A 型インフルエンザウイルスの亜型同定を行う事が可能になった。また、本方法では、亜型同定と同時に、HA 遺伝子の開裂部位の配列も解析するので、H5 亜型および H7 亜型ウイルスについては、高病原性鳥インフルエンザウイルスであるかどうかの判定も行うことが可能である。

本方法は、わが国のインフルエンザウイルス株サーベイランスやパンデミック発生初期における診断に役立つばかりでなく、未知のインフルエンザウイルスに対する診断系を迅速に構築する上で必要な遺伝子配

列情報をすぐに提供する事ができる強力なツールであり、わが国の感染症対策にも大きく貢献する技術と考えられる。

鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築ならびに国内検査体制の整備

2012 年度には、全国 74 地方衛生研究所を対象としたウイルス遺伝子同定検査に関する技術研修が実施されていたことや、毎年開催している全国 16 カ所の検疫所を対象とした技術研修等により、各地方衛生研究所および検疫所の担当者が、核酸検出検査に関して精通しており、全国規模の鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検査体制整備も円滑に進んだと考えられ、今後も外部精度管理あるいは研修などを行って、各施設の検査精度を維持する事が重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C; The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*. 424(1):45-55, 2011
- 2) Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 83(7):1121-1127, 2011
- 3) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S;

Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*. 180(1-2):68-74, 2012

- 4) 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, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65(1):19-27, 2012.
- 5) Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*, 86(19):10805-20, 2012
- 6) 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, Othmer G. Engelhard. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals*, 40(1):96-99, 2012
- 7) 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、小渕正次、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](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf)
- 8) 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、小渕正次、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](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf)
- 9) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 188(1-2):73-75, 2013.
- 10) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology* 158(4):859-876, 2013
- 11) Tsutomu Kageyama, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Hong Xu, Shinya Yamada, Yuko Uchida, Gabriele Neumann, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 18(15). 20453-20468, 2013. Erratum in: *Euro Surveill.* 18(16):20459, 2013.
- 12) Miho Kobayashi, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Hiroyuki Tsukagoshi, Mika Saitoh, Taisei Ishioka, Yoko Yokota, Hirokazu Kimura, Masato Tashiro, Kunihisa Kozawa. Novel Reassortant Influenza A(H1N2) Virus Derived from A(H1N1)pdm09 Virus Isolated from Swine, Japan, 2012. *Emerg Infect Dis.* 19(12):1972-1974, 2013
2. 学会発表  
国内会議
- 1) 影山 努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第33回研究会. 2012年6月
- 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
- 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の2例. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
- 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月



- 5) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代眞人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
  - 6) 大場邦弘, 田中智子, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザおよび RS ウイルス感染症診断の臨床的検討. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2013 年 10 月
  - 7) 林 健太, 加藤昭生, 大場邦弘, 小鍛治雅之, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. インフルエンザ A/H3N2 感染を契機に発症した横断性脊髄炎の 4 歳男児. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013 年 10 月
  - 8) 影山 努, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 田代眞人, 大場邦弘, 改田 厚, 久保英幸. Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルスの同定について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
  - 9) 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 天羽清子, 影山 努. 乳幼児呼吸器感染症からのコロナウイルス検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
  - 10) 高橋 仁, 田中仁喜, 西村研吾, 高山郁代, 中内美名, 永田志保, 小林美栄, 藤博幸, 大西和夫, 横田(恒次)恭子, 田代眞人, 影山 努. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
  - 11) 高山郁代, 中内美名, 高橋 仁, 田代眞人, 影山 努. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理についての検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
  - 12) 小林(石原)美栄, 高橋 仁, 西村研吾, 高山郁代, 大西和夫, 板村繁之, 影山努, 横田(恒次)恭子. H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
  - 13) 中内美名, 高山郁代, 高橋 仁, 大場邦弘, 田代眞人, 影山 努. B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 国外会議
- 1) Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
  - 2) Ikuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and

- Resistance, Rio de Janeiro, November, 2011
- 3) Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
  - 4) Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Aina, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
  - 5) Koichiro Iha, Mina Nakauchi, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa: Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
  - 6) Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
  - 7) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Minori Ohyama, Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Seiji P Yamamoto, Kaoru Goto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyama. High Proportion of Multiple Infections with Respiratory Viruses in Young Children with Acute Respiratory Tract Infections. European Congress of Virology 2013. Lyon. September. 2013
  - 8) Hitoshi Takahashi, Kazuo Ohnishi, Kengo Nishimura, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, 5-10 September 2013.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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

添付資料 1

鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスへの検査関連対応

2013年3月31日	中国で発生した3例について、全長シーケンスが公開
中国からの分離株 到着前	系統保存および流行予測事業で集められた鳥・ブタインフルエンザウイルスライブラリーにあつた国内分離株から陽性コントロール株を選出 ユーラシア系統H7亜型のHA遺伝子検出系のプライマー、プローブを設計
4月10日	中国CDCより、A/Anhui/1/2013ウイルス株が到着→構築した検出系の感度確認
4月11、12日	地衛研・検疫所用、プライマー、プローブ発注
4月12日	全国74地衛研および16検疫所へ、乾燥化した陽性コントロールを感染研から発送 WHO GISRS (Global Influenza Surveillance and Response System) 内でH7検出系プロトコールの情報提供を行った
4月16日	全国74地衛研および16検疫所へ遺伝子検査用試薬、プライマー、プローブが配布完了 (各メーカーより直送) 地衛研へ、「鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出マニュアル (第1版)」をメーリングリストにて送付
4月中	海外6カ所のNational Influenza Centerへ遺伝子検査キットの送付完了
5月22日	感染研HPで、一般向けに遺伝子検査マニュアルの公開ならびに、それに関する質問フォームの開設
5月23日	国内で販売されている20の迅速診断キットへの反応性に関する検討結果をHPで公開
6月21日	「鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出マニュアル (第2版)」を公開 (RT-LAMP法追記)
7月3日	遺伝子検査をより正確に行うためのタグ入り陽性コントロールを作成し、地衛研へ配布

## 鳥型からヒト型への変異に関する分子基盤とその監視技術の開発

研究分担者 鈴木康夫 中部大学 教授

**研究要旨** 1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) およびそのヒト型適応変異ウイルスを短時間、簡便に識別できるイムノクロマト原理を応用したアッセイキットを開発し、これを、海外 (H5N1 発生国、エジプト、ベトナムなど) にも適用し、ヒト型レセプター結合性変異獲得を実際に監視する体制を構築した。2) H5N1 のヒト型レセプター結合性獲得変異を高感度に検出する糖鎖マイクロアレイの試作デバイスを開発した。このデバイスは、鳥型、ヒト型レセプター結合特異性を検出できるのみならず、20 種類の異なるシアロ糖鎖構造に対する結合特異性も検索可能である。3) 宿主動物のレセプターシアロ糖鎖の精密解析を行うと同時に、動物、ヒトから分離されたウイルスのレセプター結合特異性を調べる技術を開発した。その結果、エジプトのニワトリから分離された H5N1 の中で、ヒト適応変異を遂げた変異株を発見した。4) 天然および化学合成化合物に付き抗インフルエンザウイルス活性を調べ、複数の新規ウイルス阻害剤を見出した。これらの技術、新規分子は、高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び緊急対応に適用・実用化出来るものであり、展開が期待される。

### A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) のヒトへの伝播は、鳥ウイルスのヒト型レセプターへの結合性変異が第一義的に重要であるが、それを簡便に監視する技術は開発されていない。さらに、ウイルスの変異を克服した次世代の抗インフルエンザ薬も開発されていない。そこで、本研究では、(1) 鳥インフルエンザウイルスのヒト型シアロ糖鎖レセプター結合変異を簡便且つ高感度に監視する技術を開発する、(2) ウイルスの宿主細胞レセプターへの結合を阻止する新しい機構を持つ抗インフルエンザ薬開発の基盤を創成することを目的とする。

### B. 研究方法

ウイルスのヒトや中間宿主であるブタ、家禽などの標的器官におけるインフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖解析およびそれらの分離を行い、ヒトへの適応性変異を検索する技術を開発した。さらに、合成シアロ糖鎖ポリマー、抗 H5 モノクローナル抗体、イムノクロマト技術、シアロ糖鎖マイクロアレイによるヒトおよび鳥 H5N1 ウイルスレセプターシアロ糖鎖結合特異性監視法を様々な条件で構築した。さらに様々な天然および合成化合物に付き、ヘマグルチニンおよびシアリダーゼ活性阻害評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当無し。

## C. 研究結果

1. 高病原性鳥インフルエンザウイルス H5 モノクローナル抗体を用いるイムノクロマト技術による鳥インフルエンザウイルスの鳥およびヒト型レセプター結合特異性を簡便且つ迅速に測定するデバイス（キット）を開発した。本キットは重量 5 グラム以下で、反応は 15 分以内で完了する。本キットを海外（エジプト、ベトナムなど）にも適用し、ヒト型レセプター結合性変異獲得を実際に H5N1 発生国でも監視する体制を構築した。

2. H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合性獲得変異を高感度に検出する糖鎖マイクロアレイの試作デバイスを開発した。このデバイスは、1-4HAU のウイルス量、3 時間の反応時間で鳥型、ヒト型レセプター結合特異性を検出できるのみならず、20 種類の異なるシアロ糖鎖構造に対する結合特異性も検索可能であった。

3. インフルエンザウイルスおよび宿主細胞（MDCK 細胞および発育鶏卵 CAM）の *N*-結合型糖鎖構造を HPLC マッピング、MALDI-TOF-MS により解析する技術を開発した。これにより、ウイルススパイクの *N*-グリカン糖鎖構造は宿主細胞膜が持つ糖鎖構造を反映していること、ウシミルクホエイの *N*-グリカン糖鎖は 39 種類存在し、うち、13 種類がシアル酸含有ヒト型糖鎖レセプター（mono-, di-sialosyl 構造含有）であることを同定した。さらに、これらの糖鎖を分離し、糖鎖マイクロアレイ作成（後述）の構築に応用した。

4. 動物、ヒトから分離されたウイルスのレセプター結合特異性を調べる技術を開発し、エジプトのニワトリから分離された H5N1 の中で、ヒト適応変異を遂げた変異株を発見した。

5. 天然および化学合成化合物につき、抗インフルエンザウイルス活性を調べ、新規

ウイルス阻害剤を見出した。具体的には、

(1) インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) スパイクの機能 (シアリダーゼ活性) をこれまでと全く異なる機構 (NA 分子内アミノ酸と共有結合により強固に結合する。タミフル耐性の NA にも有効) で阻害する新しい分子 (2-deoxy-2,3 didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid) を合成し、その活性を見出した。(2) 日本産の梅から古式法により製造される梅肉エキスに存在する新物質ムメフラールは、抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。その阻害様式は、ウイルスの宿主への吸着 (抗 HA 機能)、増殖 (PFU で評価)、宿主からの発芽 (NA の機能) を阻害することを見出した。このエキスは、2009 パンデミック (H1N1) にも有効であることを確認した。(3) A, B 型インフルエンザウイルスの HA および NA の両者を阻害する全く新しい阻害機構を持つインフルエンザウイルスレセプター疑似分子を開発した。この分子は、今後発生するパンデミックインフルエンザにも適応できるものであり、感染予防、治療の療法に効果を発揮できるものである。

## D. 考察

本研究により開発したイムノクロマト技術による H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合特異性獲得変異測定キット、および高感度に鳥ウイルスのヒト型レセプターシアロ糖鎖構造認識特異性を検出可能なシアロ糖鎖マイクロアレイデバイスは、世界初である。これにより、これまでの遺伝子、抗原性の監視による変異解析では全く不可能であった、鳥ウイルスのヒト適応性変異をウイルス受容体結合特異性の変化として直接的に監視出来ることになった。この新技術は、高病原性の新型インフルエンザ発生

に対する事前準備及び緊急対応に適用・実用化出来るものであり、高い意義を持つ。また、本研究により新発見したインフルエンザウイルス NA 阻害剤および HA, NA 阻害分子 (A) は、全く新しい機構による抗インフルエンザ剤で、タミフル耐性株にも有効であり、耐性株の発現も今のところ見られないことから、次世代の抗インフルエンザ薬候補として極めて有効であることが期待される。さらに、本研究により明らかになった、日本古来の製法による日本梅肉エキス中のムメフラールの抗インフルエンザウイルス活性の発見は、日本発の民間療法の有効性を科学的に実証したものであり、今後、新型インフルエンザ発生においても民間で手軽に用いられる新しいタイプの抗インフルエンザ剤の開発に応用出来ることが期待される。

## E. 結論

本研究では、1) H5N1 のヒト型レセプター結合性獲得変異を簡便、高感度、迅速に検出するデバイス (キット) (イムノクロマトキットおよびシアロ糖鎖マイクロアレイ) を開発した。これらの技術は、これまで不可能であった、鳥 H5N1 ウイルスのヒト適応性変異を直接監視出来るものであり、高い有用性を持つ。2) 全く新しい作用機構を持つ NA 阻害剤、さらに HA, NA 両機能阻害剤を開発した。これらは、タミフル耐性株にも有効で、且つ耐性株の発現も今のところ見られない。よって、次世代の抗インフルエンザ薬として開発が期待される。3) 本研究で開発した、宿主動物のレセプターシアロ糖鎖の精密解析技術、動物、ヒトから分離されたウイルスのレセプター結合特異性を調べる技術は、今後、発生する鳥インフルエンザウイルスのヒトへ適応性変異を、迅速且つ正確に監視する上で、非常に有効であると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki: Molecular Basis of a Pandemic of Avian-type Influenza Virus. Methods and Protocols, Part 4: Overview. "*Lectins*"/*Methods in Moleculoar Biology* (Humana Press), in press (2014).
2. Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki: A Simple Viral Neuraminidase-based Detection for High-throughput Screening of Viral Hemagglutinin-host Receptor Specificity. Chapter 10. "*Lectins*"/*Methods in Moleculoar Biology* (Humana Press), in press (2014).
3. Ryuta Ueda, Tadao Sugiura, Shinichiro Kume, Akihiko Ichikawa, Steven Larsen, Hideaki Miyoshi, Hiroaki Hiramatsu, Yasuko Nagatsuka, Fumihito Arai, Yasuo Suzuki, Toshio Hirabayashi, Toshio Fukuda, Ayae Honda: A novel single virus infection system reveals that influenza virus preferentially infects cells in G1 phase. *PLoS ONE* 8(7): e67011/journal.pone.0067011 (2013).
4. Qing Li, Jianxun Qi, Yan Wu, Hiromasa Kiyota, Kosuke Tanaka, Yoshitomo Suhara, Hiroshi Ohru, Yasuo Suzuki, Christopher Vavricka, and George Fu Gao : Functional and structural analysis of influenza neuraminidase N3 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir-resistance. *J. Virology*, 87, 10016-10024 (2013).
5. Sriwilaijaroen, N., Qi, J., Tanaka, K., Wu, Y., Li, Q., Li, Y., Yan, J., Suzuki, Y., Gao, J.F.: Novel insight into the enzymatic mechanism of influenza virus neuraminidase for the development of covalently-bound inhibitors. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/ncomms2487, (2013).
6. Sriwilaijaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Nakakita, S-I., Yamada, K., Ito, H., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Kato K., and Suzuki, Y.: Bovine milk whey for preparation of natural N-glycans: structural and quantitative analysis. *Open Glycoscience* 5, 41-50, (2012).

7. Yagi, H., Takahashi, N., Suzuki, T., Watanabe, S., Tanigawa, A., Suzuki, Y., Kato, K.: Comparative analyses of glycosylation profiles of influenza A viruses grown in different host cells. *Open Glycoscience* 5, 2-12 (2012).
  8. Suzuki, K., Koyama, T., Yingsakmongkon, S., Suzuki, Y., Hatano, K., Matsuoka, K. : Synthesis and biological evaluation of sialic acid derivatives containing a long hydrophobic chain at the anomeric position and their C-5 linked polymers as potent influenza virus inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 446-454 (2012).
  9. Yohei Watanabe, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Norihito Kawashita, Rika Mizuike, Hiroaki Hiramatsu, Nongluk Sriwilaijaroen, Tatsuya Takagi, Yasuo Suzuki and Kazuyoshi Ikuta: Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their Emergence in Birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 7, issue 5, e-1002068 (2011)
  10. Nongluk Sriwilaijaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Nobuhiro Takemae, Takehiko Saito, Hiroaki Hiramatsu, Koichi Kato, Yasuo Suzuki: N-glycans from porcine trachea and lung: Predominant Neu5Ac2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor. *PLoS ONE*, 6, issue 2, e-16302 (2011)
  11. Nongluk Sriwilaijaroen, Akiko Kadowaki, Yuriko Onishi, Nobuyuki Gato, Makoto Ujike, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yasuo Suzuki: Mumefural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus. *Food Chem.*, 127, 1-9 (2011)
2. 学会発表
1. 渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim, 大道寺 智、荒井泰葉、平松宏明、中屋隆明、鈴木康夫、生田和良：エジプトにおける患者由来 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス HA 遺伝子の変異解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会(11 月 12 日)、神戸 11 月 10-12 (2013)
  2. 渡邊洋平、伊東哲男、Madiha, M.S., Ellakany, H.F., Sriwilaijaroen, N., 平松宏明、林 司、高橋忠伸、鈴木 隆、生田和良、鈴木康夫: 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合性変異監視デバイス 第61回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) (2012年 11月).
  3. Suzuki, Y., Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Hiramatsu, H., Sriwilaijaroen, N., Takagi, T., Ikuta, K.: Possible molecular signals of avian influenza H5N1 virus for next pandemic. 4<sup>th</sup> Annual conference of Alexandria fever hospital. Infectious diseases from promise to practice. Mediterranean Azur Hotel Alexandria, Egypt. 15-16 Nov. 2012.
  4. Yasuo Suzuki, Nongluk Sriwilaijaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Nobuhiro Takemae, Takehiko Saito, Hiroaki Hiramatsu, Koichi Kato : Porcine as an intermediate host of influenza viruses: Predominant Neu5Ac2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor. IUMS (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Sapporo, The unlimited world of Microbes, Virology section., Sept. 11-16, 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

## ウイルスの伝播経路の解明、鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構

研究分担者 西藤岳彦

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

### 研究要旨

鳥インフルエンザウイルスや豚インフルエンザウイルス(SIV)の家禽、家畜での流行は、家畜衛生上の問題を引き起こすのみでは無く、家畜からヒトへの感染を引き起こす可能性があることから、公衆衛生の観点からも注意が必要である。本研究では、2010年10月から2011年3月にかけて、国内各地で発生した家禽および野鳥における高病原性鳥インフルエンザの起因ウイルス(H5N1 亜型)の遺伝子解析、2013年3月に中国で報告された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例に関して、ヒトから分離された H7N9 亜型ウイルス(A/Anhui/1/2013)の遺伝的性状、鶏、ハト、ウズラに対する感染性を検討した。また、国内で分離された SIV の遺伝子解析を行なって、国内の豚の中で H1N1pdm ウイルスと既存の SIV との間で、遺伝子再集合が起こっていることを明らかにした。これらウイルスの解析結果は、動物インフルエンザウイルスの人獣共通感染症としてのリスク評価に活用される。

### A. 研究目的

H5N1 亜型の高病原鳥インフルエンザウイルス(Highly pathogenic avian influenza virus:HPAIV)は、2003 年以降アジアを中心に家禽での世界的な流行を引き起こすともに、人への感染事例も多発しており 2003 年以降、2014 年 1 月末現在で 650 例の確定症例と 386 例の死亡者を記録している。国内では、ヒトへの感染は起こっていないが、2004 年、2007 年、2010 年 11 月から 2011 年 3 月にかけて、それぞれ H5N1 亜型 HPAIV による発生が起こっている。特に 2010-2011 年の発生は、24 の鶏農場 H5N1 亜型 HPAIV による発生のみで無く、60 例の死亡野鳥からも同亜型の HPAIV が分離されている。

2013 年 3 月 31 日に中国政府機関から、3 例の H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染事例からウイルスが分離されたとの報告があった。その後 5 月 6 日までに感染者 131 名、死亡者 32 名が報告されたが、5 月 21 日までに新たな発生が無かったことを受け中国政府は同日流行の制圧を宣言した。しかしながら、8 月 13 日までにさらに 5 名の感染と 15 名の死亡が報告された。その後 9 月には感染者の報告が無くなったが、10 月以降感染が再燃し、2014 年 1 月 29 日時点で、感染者 238 名、死亡者 56 名が確認されている。

また、2009 年に豚インフルエンザウイルス(SIV)に由来するインフルエンザウイル



スによりパンデミックウイルスが出現して以降、米国ではトリプルリアソータント H3N2 亜型 SIV と H1N1pdm ウイルスの遺伝子再集合ウイルスである H3N2v ウイルスによるヒト感染事例が多発し、2011 年から 340 名の感染、17 名の重症化、1 名の死亡が報告されている。

このように、家禽、家畜におけるインフルエンザウイルス感染症は、家畜衛生上の問題にとどまらず、人獣共通感染症として注目されているとともに、インフルエンザパンデミックウイルス出現の観点からもその発生動向については監視が重要な病原体である。この為、本研究において、2010-2011 年に国内で発生した HPAI の起因ウイルス、2013 年に中国でヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス及び国内で分離された豚インフルエンザウイルスの遺伝子解析を行なった。

## B. 研究方法

- (1) 緊急病性鑑定として、(独)農研機構動物衛生研究所での亜型同定試験、病原性推定の依頼のあった 2010-2011 年に分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス計 27 株および 2009 年以降に分離された豚インフルエンザウイルス(SIV) 11 株、国内で野生のカモ類分離された H7 亜型ウイルス 8 株のウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を行なった。
- (2) H7N9 亜型インフルエンザウイルス A/Anhui/1/2013 株  $8.2 \log_{10} \text{EID}_{50}/200\text{ul}$  を鶏 12 羽に静脈内接種し、10 日間観察し、鶏に対する病原性を検討した。
- (3) 鶏、ウズラ、ハトに  $10^6, 10^4, 10^2 \text{EID}_{50}/200\text{ul}$  の A/Anhui/1/2013 株を経鼻

接種し、10 日間経過を観察すると共に、経時的に口腔（鶏は気管）及びクロアカスワブを採取し、スワブ中のウイルス力価を発育鶏卵を用いて測定した。

## C. 研究結果と考察

### 2010 年 11 月から 2012 年 3 月までに国内で発生した高病原性鳥インフルエンザの起因ウイルスの遺伝子解析

2010 年 11 月から 2012 年 3 月までに国内で発生した高病原性鳥インフルエンザの起因株および同時期に飼育鳥、野鳥から分離されたウイルスの HA 遺伝子間の塩基配列の相同性は、99%以上ときわめて高いことが明らかとなった。これらのウイルス HA 遺伝子は、韓国で同時期に発生した HPAI の起因ウイルス同様、2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV と同じ WHO/FAO/OIE H5N1 Evolution working group の提唱する clade 2.3.2.1 に属することが明らかとなった。これらのウイルスについて、HA 遺伝子以外の他の 7 つの遺伝子分節の解析を行なった結果、PA 遺伝子をのぞく 6 つの遺伝

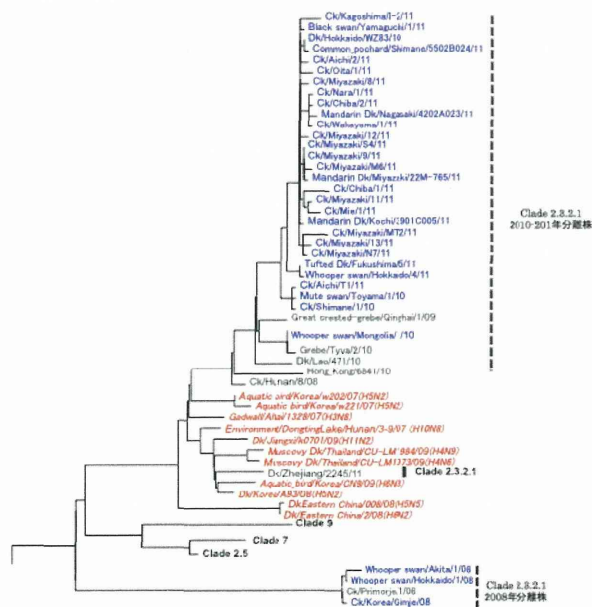


図1 H5N1亜型HPAIVのPA遺伝子系統樹

子分節は、HA 遺伝子と同様 2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV と同じグループに属していることが示された。

一方、PA 遺伝子は 2007 年から 2009 年に韓国、中国、タイ等で野鳥から分離された鳥インフルエンザウイルスの PA 遺伝子と高い遺伝的相同性を示した (図 1)。2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV の PA 遺伝子との相同性は 97% と低い値であった。このことは、2010-2011 年に国内で分離されたウイルスは、2007 年以前に存在していたクレード 2.3.2.1 ウイルスとこれまでに知られていない H5N1 亜型ウイルスのクレードのウイルスとの遺伝子再集合ウイルスであることが示唆された。

### 2013 年に中国でヒトから分離された H7N9 亜型ウイルスの解析

2011 年以降、国内で野鳥から分離された H7 亜型ウイルス 8 株の HA 遺伝子を解析したところ、A/Anhui/1/2014 株同様、ユーラシア系統に属していた。しかしながら、A/Anhui/1/2014 株の HA 遺伝子とは、同じユーラシア系統ながら明らかに異なるクレードに属していることが明らかになり、A/Anhui/1/2014 株との遺伝的関連は否定された。

静脈内接種による鶏に対する病原性試験の結果、12 羽中 11 羽が 10 日間の観察期間中生存した。接種 10 日目の気管スワブからはウイルス排泄は認められなかったが、クロアカからは平均  $3.6 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$  のウイルス排泄が認められた。また、生存した 11 羽については、観察終了時点で血中の抗インフルエンザウイルス抗体が陽性であった。死亡した個体の肺では、免疫組織化学的検索により、ウイルス抗原が確認されたが、

病変は認められなかった。

$10^6, 10^4, 10^2 \text{ EID}_{50}/200\text{ul}$  の A/Anhui/1/2013 株を経鼻接種した鶏では、接種量依存性の感染が認められた。すなわち、 $10^6 \text{ EID}_{50}$  接種群では 100%、 $10^4 \text{ EID}_{50}$  接種群では 50%、 $10^2 \text{ EID}_{50}$  接種群では、0% の感染率であった。一方、ウズラでは全ての群において全ての群において、感染が認められた。ハトでは感染率と接種容量に関連は見られず、また、感染率も 50% 以下であった。

### 国内で分離された SIV の遺伝的解析

国内で分離された SIV の遺伝的由来に関する解析では、2009 年、2010 年に大阪、山形で分離された SIV(A/sw/Osaka/1/2009, A/sw/Yamagata/2010)、成田空港動物検疫所で海外からの輸入豚から検出された A/sw/Narita/aq21/2011 がヒトパンデミックウイルスであることが判明した。

一方、栃木県、三重県で 2011、2012 年に病性鑑定に供された豚から分離されたウイルスは、表面抗原である HA、NA 遺伝子は従来から国内で循環していた H1N2 亜型ウイルス、その他 6 本の内部遺伝子はパンデミックウイルスに由来する遺伝子再集合ウイルスであった。

横浜動物検疫所で輸入豚から検出された A/sw/Yokohama/aq114/2011, A/sw/Yokohama/aq138/2011 は、北米で循環しているトリプルリアソータントであった。

### D. 結論

2010-2011 年に国内で分離された H5N1 亜型ウイルスの全ゲノム解析によって、これらのウイルスが野鳥の中で生じた遺伝子再集合ウイルスである可能性が示された。このことは、野鳥の群れの中に HPAIV がある

程度長い期間とどまっている可能性を示唆している。

ヒトから分離された H7N9 亜型ウイルス A/Anhui/1/2031 は、家禽（鶏、ウズラ、ハト）に対して、病原性が低いことが明らかになった。3 種類の家禽のウイルスに対する感受性は、ウズラが最も高いことが示された。

国内の豚の中で、既存の SIV と H1N10dm ウイルスとの遺伝子再集合が起こっていることが明らかとなった。これらのウイルスは内部遺伝子が H1N1pdm ウイルスに由来している為、人への感染リスクが既存の SIV よりも高い可能性が考えられる。輸入豚の着地検疫によって、国外からの SIV の侵入が摘発された。新たな SIV の国内への侵入に着地検疫が機能していることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Watanabe T. et al., Nature. 2013  
26:501(7468):551-5

Kageyama T. et al Euro Surveillance,  
11:18(15), 2013

Matsuu A. et al., Microbiol Immunol 56:  
792-803 (2012)

Uchida Y. et al., Virus Research 170:109-  
117(2012)

Sakoda Y. et al.,

J Gen Virol.9 3:541-50 (2012)

### 2. 学会発表

内田裕子ら

中国の人から分離された H7N9 亜型インフルエンザウイルスの家禽における性状解析  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会

Sakoda Y. et al.,

H5N1 highly Pathogenic avian influenza  
virus infections in wild birds and poultry in  
2010-2011 winter seasons in Japan.

XV International Congress of Virology, 札幌,  
2011 年 9 月

Uchida Y. et al.,

Outbreaks of H5n1 subtype highly  
pathogenic avian influenza virus in poultry  
during 2010-2011 in Japan.

XV International Congress of Virology, 札幌,  
2011 年 9 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び、緊急対応に関する研究  
(**新型インフルエンザ対策のウイルス学的評価、公衆衛生対策の評価**)

研究分担者： 押谷仁 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究協力者： 当広謙太郎、Irona Khandaker、岡田貴志、小田切崇（東北大学大学院医学系研究科）、

神垣太郎（東北大学大学院医学系研究科 助教）

岡本道子（東北大学大学院医学系研究科 助教）

鈴木陽（東北大学大学院医学系研究科 助教、2013年10月1日より

米沢病院小児科）

### 研究要旨

#### 研究 1：「被災地におけるインフルエンザ流行に関する検討」

分子生物学的解析：避難所および被災地の医療機関にてインフルエンザを疑った患者より検体採取を行い、独自のインフルエンザモニタリングを行った。震災前後での A 型インフルエンザウイルス(H3N2)の流行株の変異、および B 型インフルエンザウイルスの外部から流入を確認した。

疫学解析：避難所におけるインフルエンザ発症者の解析を行った。避難所は高齢者が多いが初発患者は青年層の男性であり、その後「同室内」および「家族内」で感染していたと推測された。

#### 研究 2：「インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の分子進化」

2009 から 2011 年に仙台市内で流行した A(H1N1)pdm09 の HA および NA 遺伝子の分子生物学的解析を行った。2009-2010 シーズンと比較し、2010-2011 シーズンの分離ウイルスにて遺伝子の多様性が観察された。

#### 研究 3：「B 型インフルエンザウイルスの Restriction Fragment Length Polymorphism」

臨床検体から直接、山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した。

#### 研究 4：「仙台市とフィリピンで流行した Influenza C virus の流行動態把握とウイルスの性状比較および分子進化の検討」

2008 年以降仙台市内で流行した Influenza C virus と、2009 年以降フィリピンで流行した同ウイルスの分子生物学的解析を行った。仙台、フィリピンともに研究期間中に分離されたウイルスでは抗原性の変化は見られなかったが、異なるリアソートメントを起こしながらそれぞれの地域で Influenza C virus が流行していることが示唆された。