

ベトナムにおいてヒトから分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の 性状解析に関する研究

研究分担者 白倉 雅之

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

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。このような背景から、アジア諸国の感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークを推進し、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施することは、極めて重要な意義を持つと考えられる。そこで、本研究では、共同研究機関であるベトナム・ホーチミン・パスツール研究所から分与されたヒト分離鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析、抗原性解析を実施した。その結果、分離ウイルス株は、クレード 2.3.2.1c に属し、抗原性解析の結果から、既存のワクチン製造候補株との反応性が低いことが分かった。今後、さらにラボラトリーネットワークを強化し、継続的にウイルスの分子疫学的研究を実施することが大切であると考えられる。

A . 研究目的

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。世界保健機関（WHO）の報告によれば、2015 年 1 月 26 日現在、16 カ国で、718 例の感染者数が確認され、そのうち 413 名が死亡している。さらに、2013 年 3 月に発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは、中国さらに他の周辺諸国に拡大している。WHO の報告では、2015 年 1 月 26 日現在、486 例の感染者数が確認され、そのうち 185 名が死亡している。また、現在のところ、ヒトへの感染例は報告されていないが、鳥インフルエンザ A(H5N8)ウイルスが猛威を振るい、我が国をはじめ、中国、台湾、韓国などのアジア諸国、またヨーロッパ諸国、北米にまで拡大している。

これらのウイルスがヒトからヒトへ容易に伝播可能なウイルスに変異し、新型インフルエンザの出

現が危惧されている。このような背景から、アジア諸国、特に東南アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークを推進し、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施することは、インフルエンザウイルスのグローバルサーベイランスを実施する上でも、極めて重要な意義を持つと考えられる。

本研究により、アジアの感染症担当ネットワークの強化が図られ、インフルエンザウイルスの流行状況に関する情報を迅速に得られ、ウイルス分子疫学的研究を行うことにより、流行ウイルスのリスク評価を実施することが可能となる。また、ウイルス株サーベイランスを実施することによりワクチン候補株の選定、さらに分与された鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスを元にしたワクチン製造候補株の開発に貢献することが出来る。また、解析データに基づいた抗インフルエンザ薬開発の基盤研究に寄与することが期待でき、共同研究国における公衆衛

生の向上に寄与すると同時に、わが国における新型インフルエンザ対策に貢献することが期待出来ると考えられる。

本研究では、共同研究先機関であるベトナム・ホーチミン・パスツール研究所から分与されたヒト分離 A/H5N1 亜型ウイルスの遺伝子解析、抗原性解析を実施した。また、ラボラトリーネットワークの促進・強化と共同研究の推進を図るために、パスツール研究所を訪問し、ウイルス株の分与に関する協議、サーベイランス技術指導と今後の共同研究に関する打ち合わせを行った。

B . 研究方法

1) 検体材料：2014 年にベトナム南部において、鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルス感染疑い患者から採取された咽頭ぬぐい液を 2 検体 (症例 1) ビンフオック省、52 歳男性、症例 2) ドンタップ省、60 歳女性、いずれも死亡、病気の家禽との接触歴あり) 分与され分離を試みた。臨床検体を 10 日齢発育鶏卵の漿尿膜腔に接種し、培養後、漿尿液を回収した。回収した漿尿液はニワトリ赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定した。

2) 遺伝子解析・系統樹解析：回収した漿尿液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から、A 型インフルエンザウイルス共通プライマー (Uni12 primer: 5' -AGCAAAAGCAGG-3') を用いて逆転写反応 (SuperScript III: Invitrogen) により cDNA を合成した。得られた cDNA を各遺伝子に対する特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅を行った。PCR 産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit、ABI3730xl を用いたダイレクトシーケンシングにより各遺伝子の塩基配列を決定した。HA 遺伝子については、分子進化・系統学的解析ソフトウェアである MEGA ver. 5 を用いて近隣結合法 (NJ 法) により系統樹解析を行った。

3) 抗原性解析：米国 CDC から供与、あるいは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で作製されたフェレット抗血清を用いて、常法

に従い赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行った。赤血球は 0.5% ニワトリ赤血球を使用した。

C . 研究結果

分与された 2 検体のうち、1 検体 (症例 1) でウイルスを分離することが出来た (株名: A/Vietnam/14011801/2014 (H5N1)) 。この分離株の HA 遺伝子解析、系統樹解析を行った結果、分離ウイルス株は、クレード 2.3.2.1c に属することが明らかとなった (図 1) 。また、HA 遺伝子のレセプター特異性に関連する変異、すなわちヒト型レセプターをも認識する変異は、認められなかった。さらに、ヒト上気道の温度である低温下においてもウイルスが効率よく増殖出来る PB2 蛋白の変異 (627 番目のアミノ酸のグルタミン酸からリシンへの変異) についても認められなかった。

さらに HI 試験による抗原性解析の結果、近傍クレードに属する既存ワクチン製造候補株 (IDCDC-RG30 株) に対するフェレット抗血清に対する反応性は、ホモ価と比較して 8 倍以上低下していた (図 2) 。また、これまでに分離された同クレードのウイルス株に対するフェレット抗血清に対してもホモ価と比較して 8 倍以上低下した。これらの結果から、今回分離されたウイルス株は、これまでに分離されたウイルス株と比較して、抗原性の異なるウイルスであることが示された。

これらの解析データについては、共同研究先機関であるホーチミン・パスツール研究所へフィードバックした。さらに、WHO ワクチン選定会議においてデータ活用された。

また、ホーチミン・パスツール研究所を訪問し、現地スタッフとウイルス株の分与に関して分与株の選定、分与時期について協議した。また、ウイルスサーベイランスに必要な基本技術に関して技術指導を行った。

D . 考察

今回、解析したウイルス株は、HA 遺伝子解析の結果、クレード 2.3.2.1c に属することが分かった。

同クレードのウイルスは、中国、インドネシア、ベトナムにおいて野鳥間で流行している。また、ベトナム南部及びラオスにおいて、家禽の間に広がっている。また、インドネシアにおいても、現在までにヒトへの感染例は報告されていないが、このクレードに属するウイルスは 2012 年から家禽で報告されている。

抗原性解析の結果から、類似クレードに属する既存のワクチン製造候補株との反応性が低かった。現在、同クレードのワクチン製造候補株が、英国NIBSCにおいて開発中であるので、今後、そのワクチン製造候補株に対する抗血清との反応性を検討する必要がある。

E . 結論

本研究により、今回、ベトナム・ホーチミン・パスツール研究所との共同研究によって、ベトナムにおいて発生したヒト分離高病原性鳥インフルエンザウイルスA(H5N1)の性状解析を実施することが可能となり、ベトナムにおける鳥インフルエンザA(H5N1)ウイルスの発生状況、ウイルス学的特徴を捉える事が出来た。このことは、共同研究先、さらに我が国の新型インフルエンザ対策に大きく貢献出来ると考えられる。今後、更なるラボラトリーネットワークの推進・強化を図り、継続的に共同研究機関と、より多くのウイルス株の分子疫学的研究を実施することが重要であると考えられる。

F . 健康危険情報

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1) ヒトから分離された鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析

Phylogenetic relationships of H5 HA genes clade 2.3.2.1

Vaccine candidate

Virus analyzed at NIID in blue

HI reference viruses in red

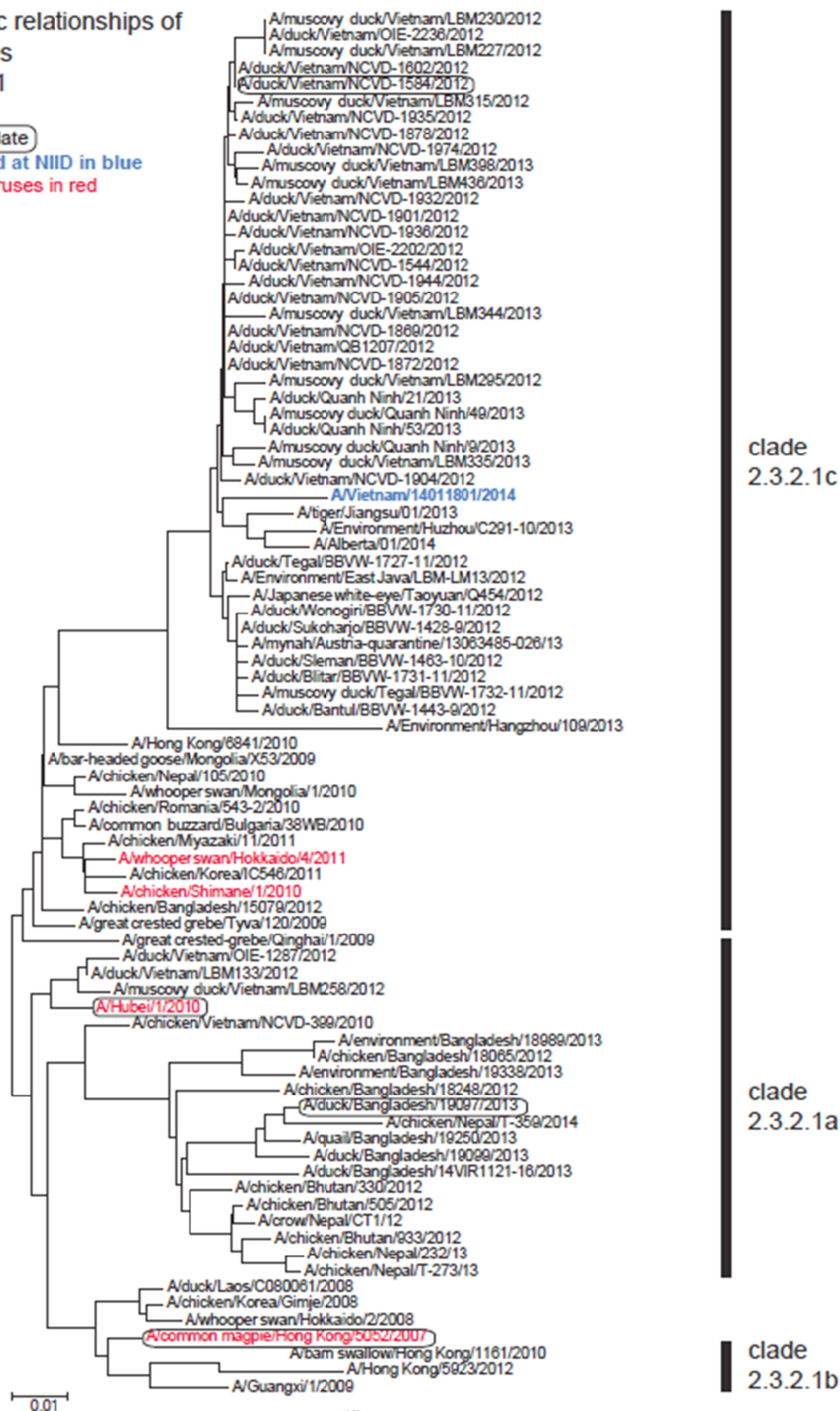


図 2) ヒトから分離された鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスの HI 試験による抗原性解析

	Ferret sera								Passage history	
	1	2.1.3.2	2.2.1	2.3.2.1	2.3.2.1c	2.3.2.1c	2.3.2.1a	2.3.4		
	NIBRG-14	NIIDRG-9	IDCDC- RG11	SJRG- 166615	Ws/Hokkaido/ 4/11	Ck/Shimane/ 1/10	IDCDC- RG30	IBCDC- RG5		
REFERENCE ANTIGENS										
NIBRG-14 [A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)]	1	160	<10	10	10	<10	10	20	10	V1E2/E1E1
A/Indonesia/NIHRD11771/2011 (H5N1) (NIIDRG-9)	2.1.3.2	10	640	20	<10	10	20	20	20	LLC1E3
A/Egypt/321-NAMRU3/2007(H5N1)-PR8-IDCDC-RG11	2.2.1	10	<10	640	40	<10	80	40	10	V1E2/E2E1
SJRG-166615 [A/common magpie/HK/5052/2007 (H5N1)]	2.3.2.1	<10	<10	20	320	40	160	40	<10	V+CEK1/Ex/E1
A/whooper swan/Hokkaido/4/2011 (H5N1)	2.3.2.1c	<10	<10	10	80	160	160	80	<10	E1/E2
A/chicken/Shimane/1/2010 (H5N1)	2.3.2.1c	<10	<10	20	80	40	320	80	<10	E2/E2
A/Hubei/1/2010 (H5N1)-PR8-IDCDC-RG30	2.3.2.1a	20	<10	80	160	80	640	320	<10	V1E2/E2E1
A/Anhui/1/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG5	2.3.4	10	10	160	<10	<10	40	40	160	V1E2/E2E1
TEST ANTIGENS										
A/Vietnam/14011801/2014 (H5N1)	2.3.2.1c	<10	<10	20	40	20	40	10	<10	E1