

## 高病原性鳥インフルエンザウイルス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

協力研究者：有田知子、鈴木康司、高山郁代

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

### 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高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。さらに、2013年に発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは、季節に応じて発生と消失を繰り返している。このような背景から、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒトへの感染リスク評価を実施することは、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、鳥インフルエンザウイルスのリスク評価のため、またワクチン製造候補株選定のため、インドネシア国及びネパール国において、ヒトから分離された H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスの次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析及び抗原性解析を行った。その結果、解析に用いた H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、既存のワクチン製造候補株に対する抗血清に良く反応した。

### 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高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)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、2020年1月20日現在、17カ国で、861例の感染者数が確認され、そのうち455名が死亡している。さらに、2013年3月に中国で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。また、鳥インフルエンザ A(H5N6)ウイルスが我が国をはじめ、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。

本研究では、鳥インフルエンザウイルスのヒトへのリスク評価として、インドネシア国及び

ネパール国において、ヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析、抗原性解析を実施した。

### B. 研究方法

#### 1) ウイルス：

高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) A/Indonesia/NIHRD17109/2017（インドネシア株）、A/Nepal/19FL1997/2019（ネパール株）

これらのウイルスを発育鶏卵を用いて増殖させ、七面鳥赤血球（TRBC）を用いて赤血球凝集（HA）価を測定し、ストックした。

2) 全ゲノム解析：ウイルス全ゲノム解析は、次世代シーケンサーを使用して行った。ウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を Multi-segment RT-PCR により増幅後、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina

(New England Biolabs)を使用して DNA ライブラリーを調製後、MiSeq (Illumina) にて解析した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を使用して、リファレンス配列との Assemble を行い、コンセンサス配列の作成と変異解析を行った。

3) HI 試験：七面鳥赤血球 (TRBC) を用いて定法に基づいて行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C. 研究結果

インドネシア国及びネパール国において、ヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを受け入れ、遺伝子解析及び抗原性解析を行った。

1) 遺伝子解析：

インドネシア株は、H5 Clade 2.3.2.1e に属することが分かった。本ウイルスは、これまでにインドネシアにおいて、トリから分離報告されている株と類似していた。

ネパール株については、H5 Clade 2.3.2.1a に属し、バングラデシュ国及びインド国等の南アジアにおいて、トリから分離報告されている株と類似していた。遺伝子解析結果から、哺乳動物において病原性が増強されると報告されている PB2 の 627K の変異が認められた。

2) 抗原性解析：

インドネシア株と同クレードにおけるワクチン製造候補株は、現在のところ、まだ作製されていない。そこで、Clade 2.3.2.1a に属するワクチン製造候補株である SJ007 (A/duck/Bangladesh/19097/2013) 株との反応性を調べた結果、インドネシア株は SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

ネパール株については、同クレードのワクチン製造候補株である SJ007 (A/duck/Bangladesh/19097/2013) 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。さらに、2つ

の株を用いてフェレット抗血清を作製し、抗原性解析を行った結果、同クレードの株とも抗原性が異なる結果となった。

### D. 考察

本研究において、解析に用いたネパール株は、既存のワクチン製造候補株である SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。しかしながら、インドネシア株は、Clade 2.3.2.1e に属するワクチン製造候補株がなく、Clade 2.3.2.1a との反応性を調べた。本株との類似株の発生状況によっては、同クレードに属する新たな RG ワクチン製造候補株の必要性を示唆する結果となった。

### E. 結論

本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価試験の一環として、インドネシア及びネパール国において分離された株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。これらの国においては、未だヒト感染例が絶えず報告されていることから、今後も継続的なグローバルサーベイランスの実施が必要であると考えられる。

### F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama

T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020, 2, doi: 10.1111/irv.12728

## 2. 学会発表

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. *Options X for the control of influenza*. (Singapore) 2019. 8.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Sato K, Watanabe S, Odagiri T. Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Options X for the control of influenza*. (Singapore) 2019. 8.
- 柴田明弘、原田理恵子、岡松正敏、松野啓太、有田知子、鈴木康司、白倉雅之、小田切孝人、竹前喜洋、内田裕子、西藤岳彦、迫田義博、尾坂優之。海外から持ち込まれた携帯品非加熱家きん畜産物から分離された H7N3 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析。第 162 回日本獣医学会（つくば）2019 年 9 月
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会（東京）2019 年 10 月
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Takayama I, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. 第 67 回日本ウイルス学会（東京）2019 年 10 月
- 高下恵美，藤崎誠一郎，白倉雅之，中村一哉，岸田典子，桑原朋子，三田村敬子，安倍隆，市川正孝，山崎雅彦，渡邊真治，小田切孝人，長谷川秀樹。2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況。第 51 回日本小児感染症学会（旭川）2019 年 10 月