

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、H5N6型及びH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルス、携帯品非加熱家きん肉から分離されたH7型及びH9N2型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。鳥インフルエンザウイルスによるヒト感染例は、未だ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。

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、分与された鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス：

1-1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N6)

A/mute swan/Shimane/3211A001/2017（島根株）、

A/Northern Goshawk/Tokyo/1301B003T/2018（東京株）、

A/chicken/Kagawa/1T-1/2018（香川株）、A/jungle crow/Hyogo/2803E024T/2018（兵庫株）

1-2) 鳥インフルエンザウイルス A(H7)

A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9)

、A/Taiwan/1/2017(H7N3)、携帯品非加熱家きん肉から

分離された A/duck/Japan/AQ-HE28-3/2016(H7N9)、

A/duck/Japan/AQ-HE29-22/2017(H7N9)

、A/duck/Japan/AQ-HE29-52/2017(H7N9)

、A/duck/Japan/AQ-HE30-1/2018(H7N3)

1-3) 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）

1-4) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)

米国 CDC 及び St. Jude Children's Research Hospital より分与された下記の株を実験に使用した。

A/duck/Bangladesh/25683/2015(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35439/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35835/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35924/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35986/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/38175/2019(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/17D1012/2018(H5N1)

1-5) 鳥インフルエンザウイルス A(H9N2)

動物検疫所より分与された下記の株を使用した。本株は、ベトナム国ホーチミン由来の携帯品非加熱家きん肉から分離された株である。

A/ckicken/Japan/AQ-HE31-26/2020(H9N2)

上記に記載したウイルス株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

1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N6)

2017/18 シーズンに国内において分離された H5N6 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。遺伝子解析の結果、分与されたすべての国内分離株は、H5 Clade 2.3.4.4b に属することが分かった。また、これらのウイルス株の HA 遺伝子は、2017/18 シーズンに韓国において分離報告された H5N6 株と類似していた。抗原性解析の結果、同クレードのワクチン製造候補株である IDCDC-RG42A(A/Sichuan/26221/2014) 株、NIID-001(A/duck/Hyogo/1/2016)株のフェレット抗血清に良く反応した。さらに、島根株のフェレット抗血清を作製し、分与株との反応性を調べた結果、島根株に対するフェレット抗血清は、東京株、香川株及び兵庫株と良く反応した。

2) 鳥インフルエンザウイルス A(H7)

2017 年に中国及び台湾において分離された H7N9 型高病原性鳥インフルエンザウイルス Guangdong 株、及び Taiwan 株を受け入れた。さらに、携帯品非加熱家きん肉から分離された H7N9 型高病原性鳥インフルエンザウイルス及び H7 型低病原性鳥インフルエンザウイルス AQ-HE28-3/2016(H7N9)、AQ-HE29-22/2017(H7N9)、AQ-HE29-52/2017(H7N9)、AQ-HE30-1/2018(H7N3)株を分与された。抗原性解析の結果、ワクチン製造候補株の IDCDC-RG56N 株に対するフェレット抗血清に Guangdong 株、Taiwan 株、AQ-HE28-3/2016(H7N9)、AQ-HE29-22/2017 株、AQ-HE29-52/2017 株は反応したが、AQ-HE30-1 株

については、ホモ価より 8 倍低下しており、抗原性が異なることが分かった。さらに AQ-HE30-1 株に対するフェレット抗血清を作製し、分与株との反応性を調べた結果、分与された高病原性及び低病原性鳥インフルエンザウイルスのすべての株に良く反応した。

3) 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。遺伝子解析の結果、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增强されると報告されている PB2 の 627K の変異が認められた。

抗原性解析の結果、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。

4) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)

遺伝子解析の結果、バングラデシュ国由来株は、すべて H5 Clade 2.3.2.1a に属することが分かった。これらの株は、これまでにバングラデシュ国において、トリから分離報告されている株と類似していた。また、全ゲノム解析を実施した結果、特に、哺乳動物においてウイルス増殖を增强させる変異及び抗ウイルス薬に耐性を示す変異は認められなかった。抗原性解析の結果、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、分与されたバングラデシュ国由来株は SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

5) 鳥インフルエンザウイルス A(H9N2)

遺伝子解析の結果、本株は、H9 ウイルス系統で

ある Y280/G9 系統に属することが分かった。近年、ベトナム国において分離報告されている株と類似していた。抗原性解析の結果、H9 Y280/G9 系統に属するワクチン製造候補株である A/chicken/Hong Kong/G9/97 株との反応性を調べた結果、本株は、A/chicken/Hong Kong/G9/97 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

D. 考察

・H7N9 型高病原性あるいは低病原性鳥インフルエンザウイルス株は、既存の H7 ワクチン製造候補株である IDCDC-RG56N 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、AQ-HE30-1/2018(H7N3)株は、抗原性が異なる結果となり、本株あるいは類似株の発生状況によっては、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。

・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。

・解析に用いたバングラデシュ国由来 H5N1 株及び H9N2 株は、現時点では、各々、既存のワクチン製造候補株に対するフェレット抗血清に良く反応した。従って、現時点においては、新たな RG ワクチン製造候補株作製が必要ないことが示唆された。しかしながら、該当国においては、鳥インフルエンザウイルスが、鳥において流行を繰り返していることから、今後、抗原変異株の出現が想定される。

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、ヒト分離及び鳥由来の鳥インフルエンザウイルス株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。鳥インフルエンザウイルスによるヒト感染例が未だ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, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus

Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390

・ Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. *Pathogens.* 2020 9, 9(9), 725

・ Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res.* 2020 8, 180, 104828

・ 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

- Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. ,71(3),234-238,2018
- Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks. Archives of Virology,164(2),535-545,2018
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. ,6;9,3026,2018
- Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. ,24(3),op,2019
- 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
- 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. 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

2. 学会発表

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M,

sites of its hemagglutinin. Options X for the control of influenza. (Singapore) 2019.8.

- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第66回日本ウイルス学会 (京都) 2018年10月
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第66回日本ウイルス学会 (京都) 2018年10月
- Asanuma H, Aina A, Ujike M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Nagata N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M. Increased pathogenicity in mice of a mouse-adapted influenza H7N9 virus was associated with delayed host innate immune responses. 6th International Influenza meeting (Munster, Germany) 2018.9.
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting (Verona, Italy) 2018.6.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino

acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting (Verona, Italy) 2018.6.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし