

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2011～2015

課題番号：23406017

研究課題名(和文) エジプトとタイにおける家畜・家きん由来インフルエンザウイルス性状変化追跡調査研究

研究課題名(英文) Surveillance study tracking the changing nature of influenza viruses derived from domestic animals and birds in Egypt and Thailand

研究代表者

生田 和良 (Ikuta, Kazuyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教授

研究者番号：60127181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは東南アジアおよびエジプトにおいて鳥類における流行地域を獲得している。特に、エジプトは近年ヒト感染例が多く報告される特異な地域である。本研究では、イムノクロマトの原理に基づく新しい鳥インフルエンザ検出キットを開発した。また、当該キットを用いて、エジプトおよび東南アジア地域で飼育される家畜・家きんから鳥インフルエンザウイルスを検知することで、現地で蔓延するウイルスの感染状況および性状変化を評価した。その結果、エジプトにおいて、ヒトにこれまでより感染しやすい変異ウイルスが出現し、野外で現在優勢に流行していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses have become endemic in birds in Southeast Asia and Egypt. In particular, Egypt has a substantially higher prevalence of H5N1 viruses than any other country, with collateral human infection. In this study, we developed a novel immunochromatographic strip test to detect influenza virus receptor binding specificity. Using the easy-to-use detection system, we surveyed the H5N1 virus dissemination and evolutionary dynamics in the H5N1 endemic areas. The results showed that a novel H5N1 virus variant with enhanced infectivity toward humans had emerged in Egypt and is now dominant in the country.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス学 インフルエンザ 人獣共通感染症 検査 国際研究者交流 エジプト

1. 研究開始当初の背景

(1) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(以下、H5N1 ウイルス)は、東南アジアおよび中近東地域で鳥類における感染流行域を獲得している。当該地域では、鳥-ヒト間のウイルス伝播によって、ヒトに致死率が 50%と極めて高い重度の呼吸器疾患を引き起こすことから重大な社会問題となっている。繰り返されるウイルス伝播の過程において、遺伝子変異の蓄積により新しい形質を獲得した H5N1 ウイルスが出現する可能性が危惧されている。一方で、ウイルス性状の変化動態に焦点を当てた包括的な H5N1 ウイルス疫学調査はこれまで実施されていない状況にあった。

(2) インフルエンザウイルスの感染性を決定する重要な要素の 1 つは、レセプター糖鎖に対する結合親和性である。鳥インフルエンザウイルスがヒトに効率的に感染するように進化するためには、ウイルスのレセプター糖鎖指向性が $\alpha 2,3\text{Sia}$ (鳥型糖鎖)から $\alpha 2,6\text{Sia}$ (ヒト型糖鎖)に変化する必要がある。私たちの研究グループは、先行研究において、ヒト型糖鎖への親和性と高めた変異 H5N1 ウイルス群がエジプトで出現していることを明らかにしていた。そのため、エジプトにおいて当該変異ウイルス群の蔓延状況を詳細に調査する必要があると同時に、東南アジア地域において同様の H5N1 ウイルス変化動態が確認されるか調査する必要がある。

2. 研究の目的

(1) これまで実用化されていないインフルエンザウイルスのレセプター糖鎖親和性迅速診断キットを開発することで、インフルエンザ疫学調査を効率的に実施する。

(2) エジプトや東南アジア地域を拠点とする研究機関と連携することで、鳥インフルエンザウイルスが蔓延する当該地域で流行する H5N1 ウイルスの蔓延状況と性状変化動態について包括的な疫学調査を実施する。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルスのレセプター糖鎖親和性迅速診断キットの開発は、中部大学および株式会社カイノスとの共同研究により実施した。具体的には、レセプター糖鎖を模倣した sialylglycopolymer を用いて、アビジン-ビオチン増幅系とイムノクロマトの原理に基づくテストストリップを構築した。当該キットによる判定の正確性は、solid-phase direct binding assay (ELISA) 法 (Watanabe Y. *et al.*, PLoS Pathog 2009, 5:e1000654) による結果と比較することで評価した。

(2) エジプトにおける H5N1 ウイルス疫学調査では、先行研究において共同研究体制を構

築しているアレキサンドリア大学医学部・獣医学部とダマンフル大学医学部・獣医学部と連携することで、北エジプトの Alexandria および Beheira 県で飼育されている家畜・家畜をを対象に感染個体から咽頭スワブまたは臓器サンプルを採取した。

(3) 東南アジアにおける H5N1 ウイルスの調査では、J-GRID におけるベトナム拠点とインドネシア拠点を敷設する長崎大学熱帯医学研究所および神戸大学医学部と、それぞれのカウンターパートであるベトナム国立衛生疫学研究所およびアイルランガ大学獣医学部と連携することで、各地域で飼育されていた家禽からウイルスを分離して解析に用いた。

(4) 解析対象とするウイルス蔓延地域を広げるために、ウイルス株数は限定されるが、タイ、中国および日本で分離された H5N1 ウイルスについて、NCBI database に登録されたウイルス遺伝子配列からリバースジェネティクス法により組み換えウイルスを作出して解析に用いた。

(5) エジプトで採材したウイルスサンプルについては、農林水産大臣の許可を受けて日本に輸送し、大阪大学微生物病研究所 BSL3 施設において発育鶏卵接種によりウイルス分離を試みると共に RT-PCR 法によってウイルス遺伝子解析を実施した。ベトナムおよびインドネシアにおけるウイルスサンプルについては、それぞれベトナム国立衛生研究所およびアイルランガ大学の BSL3 施設において取り扱った。

(6) 開発した迅速診断キットの有用性評価をエジプト、ベトナム、インドネシアにおいて分離されたウイルス株を用いて実施した。エジプト流行株については、臨床サンプル(咽頭スワブおよび臓器サンプル)とウイルスを増殖させた漿尿液を評価に用いた。ベトナムおよびインドネシア流行株については、ウイルスを増殖させた漿尿液のみを評価に用いた。

(7) H5N1 ウイルスの遺伝子解析(3)-(4)の結果に基づき、Neighbor-Joining 法による系統解析を実施した。また、(5)により決定した各ウイルス株のレセプター糖鎖親和性を系統樹上にプロットすることで、レセプター糖鎖親和性が変化した変異ウイルス群の分布・蔓延状況と進化動態を包括的に調査した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルスのレセプター糖鎖結合親和性診断キットを世界で初めて構築した(図 1)。当該診断キットは、ウイルスサンプルと診断キットを構成するテストストリップおよび反応液があれば、簡易に目視

によってウイルスのレセプター糖鎖結合特異性を診断できる。このことから、特に鳥インフルエンザが蔓延する海外地域で有用性が高い設計である。

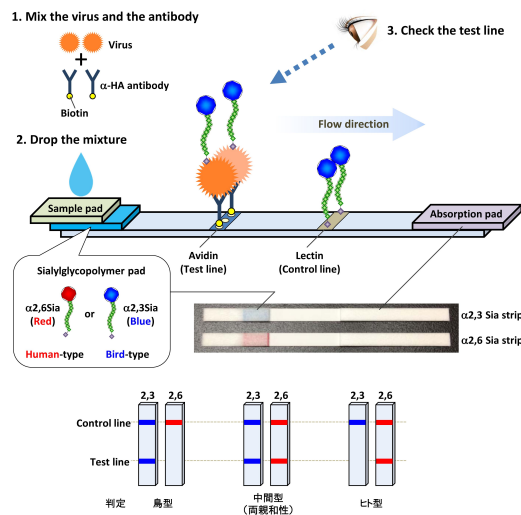


図1. インフルエンザウイルスのレセプター糖鎖結合特異性診断キットの概要

当該診断キットを用いて感度・特異性評価を実施したところ、鳥インフルエンザウイルスの鳥型糖鎖親和性およびヒトで流行する季節性インフルエンザウイルスのヒト型糖鎖親和性をそれぞれ 32 HA 力価で検出することができた。一方で、変異ウイルスが獲得する微弱なヒト型糖鎖親和性を検出するためには、128 HA 力価が必要であった。しかしながら、128-512 HA 力価のウイルスサンプルをキットに供することで、迅速（計 30 分）かつ正確にウイルスのレセプター糖鎖結合親和性を評価できることが明らかとなった。

(2) 近年のエジプト流行株（2010～2014 年）の多くが、鳥型糖鎖親和性を維持したまま、より高いヒト型糖鎖親和性を獲得しており、迅速診断キットを用いても両親和性ウイルス群がエジプトで出現していることが分かった。系統樹解析の結果から、これらのウイルス群は、2011 年以降エジプトで優勢に検出されている clade 2.2.1-C (clade 2.2.1.2) に属することが明らかとなった。一方で、以前の研究で報告された抗原性が異なるが典型的な鳥型糖鎖親和性を示す clade 2.2.1.1 は現在ほとんど検出されなかった。

(3) ベトナム流行株（2003～2013 年）は、系統樹解析の結果から clade 1, clade 2.3.2.1, clade 2.3.4 に属していることが明らかとなったが、解析した全てのウイルスが典型的な鳥型糖鎖親和性を維持していた。

(4) インドネシア流行株（2005～2012 年）は、系統樹解析の結果から clade 2.1.3 に属することが分かったが、解析した全てのウイルスが典型的な鳥型の糖鎖親和性を維持してい

た。

(5) タイ、中国および日本で分離されたウイルス株は、それぞれ clade 1, clade 2.3.4, clade 2.5 に属していたが、解析した全てのウイルスが典型的な鳥型の糖鎖親和性を維持していた。

(6) 以上の結果から、現在 H5N1 ウイルスは、アジアおよび中近東地域において遺伝的に急速に多様化することで様々な clade に進化していることが明らかとなった。また、特にエジプトでは、鳥類においてこれまでよりもヒト型糖鎖親和性が高く変化した両親和性ウイルス群が優勢に伝播していた。このことは、エジプトにおいて近年 H5N1 ウイルスのヒト感染例が際立って多い一因である可能性がある。一方で、アジア地域では、様々な clade に属するウイルスが混在して流行しているにも関わらず、レセプター糖鎖結合親和性は鳥型を維持していた。これらの知見から、エジプトは H5N1 ウイルス由来パンデミックウイルス出現の潜在性が最も高い地域であると推察された。同地域で流行する H5N1 ウイルスの進化動態を今後も注視する必要があると考えられる。これらの成果と H5N1 ウイルスに対する防疫対策については、大学および Glycoforum（糖質科学について最先端の情報を発信している専門家向け Web サイト）のホームページにおける紹介や関連学会における研究成果発表によって、広く社会へ発信した。

一方で、本研究課題における疫学調査では、エジプトにおける両親和性ウイルス群の出現機序は明らかにできなかった。エジプトで流行する H5N1 ウイルスは、ヒト適応化に重要なリメラゼ領域の変異である PB2-E627K をすでに共通して獲得している特徴がある。このような同地域に蔓延する H5N1 ウイルスの特異な進化動態について、今後さらに包括的なフィールド調査や分子ウイルス学的な解析が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Kawashita N, Ibrahim MS, El-Gendy EM, Hiramatsu H, Kubota-Koketsu R, Takagi T, Murata T, Takahashi K, Okuno Y, Nakaya T, Suzuki Y, Ikuta K (2015) Characterization of H5N1 Influenza Virus Variants with Hemagglutinin Mutations Isolated from Patients. *MBio* (査読有) 6:e00081-15. doi: 10.1128/mBio.00081-15.

Daidoji T, Watanabe Y, Ibrahim MS, Yasugi M, Maruyama H, Masuda T, Arai F, Ohba T, Honda A, Ikuta K, Nakaya T (2015) Avian Influenza Virus Infection of Immortalized Human Respiratory Epithelial Cells Depends upon a Delicate Balance between Hemagglutinin Acid Stability and Endosomal pH. *J Biol Chem* (査読有) 290:10627-10642. doi: 10.1074/jbc.M114.611327.

Watanabe Y, Ito T, Ibrahim MS, Arai Y, Hotta K, Phuong HVM, Hang NLK Mai LQ, Soda K, Yamaoka M, Poetranto ED, Wulandari L, Hiramatsu H, Daidoji T, Kubota-Koketsu R, Sriwilaijaroen N, Nakaya T, Okuno Y, Takahashi T, Suzuki T, Ito T, Hotta H, Yamashiro T, Hayashi T, Morita K, Ikuta K, Suzuki Y (2014) A novel immunochromatographic system for easy-to-use detection of group 1 avian influenza viruses with acquired human-type receptor binding specificity. *Biosens Bioelectron* (査読有) 65:211-219. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.036.

Boonsathorn N, Panthong S, Koksunan S, Chittaganpitch M, Phuygun S, Waicharoen S, Prachasupap A, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Yasugi M, Ono K, Arai Y, Kurosu T, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Watanabe Y (2014) A human monoclonal antibody derived from a vaccinated volunteer recognizes heterosubtypically a novel epitope on the hemagglutinin globular head of H1 and H9 influenza A viruses. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有) 452(3):865-870. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.008.

Pan Y, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Yasugi M, Yamashita A, Ramadhany R, Arai Y, Du A, Boonsathorn N, Ibrahim MS, Daidoji T, Nakaya T, Ono K, Okuno Y, Ikuta K, Watanabe Y (2014) Human monoclonal antibodies derived from a patient infected with 2009 pandemic influenza A virus broadly cross-neutralize group 1 influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有) 450(1):42-48. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.060.

Watanabe Y, Ibrahim MS, Ikuta K (2013) Evolution and control of H5N1. *EMBO Rep* (査読有) 14(2):117-122 (Review). doi: 10.1038/embor.2012.212.

Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Kawashita N, Daidoji T, Takagi T, Yasunaga T, Nakaya T, Ikuta K (2012) Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineages co-circulating in Egypt. *J Gen Virol* (査読有) 93: 2215-2226. doi: 10.1099/vir.0.044032-0.

Watanabe Y, Ibrahim MS, Suzuki Y, Ikuta K (2012) The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol* (査読有) 20: 11-20 (Review). doi: 10.1016/j.tim.2011.10.003.

Ramadhany R, Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Watanabe Y, Takahashi K, Ikuta K, Nakaya T (2012) Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front Microbiol* (査読有) 3:128. doi: 10.3389/fmicb.2012.00128.

Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Kawashita N, Mizuike R, Hiramatsu, H, Sriwilaijaroen N, Takagi T, Suzuki Y, Ikuta K (2011) Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog* (査読有) 7: e1002068. doi: 10.1371/journal.ppat.1002068.

Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Abd El-Hamid HS, Ikuta K (2011) Genetic diversification of H5N1 highly pathogenic avian influenza A virus during replication in wild ducks. *J Gen Virol* (査読有) 92: 2105-2110. doi: 10.1099/vir.0.032623-0.

Ibrahim MS, Watanabe Y, Ellakany HF, Yamagishi A, Sapsutthipas S, Toyoda T, Abd El-Hamid HS, Ikuta K (2011) Host-specific genetic variation of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1). *Virus Genes* (査読有) 42: 363-368. doi: 10.1007/s11262-011-0583-y.

〔学会発表〕(計 23 件)

中屋隆明、鳥インフルエンザ-H5N1/H7N9 を中心に、第 31 回日本環境感染症学会総会、京都、2016 年 2 月

大道寺 智、H7 鳥インフルエンザにおける HA 蛋白質の pH 感受性について、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2016 年 1 月

Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Tomo Daidoji, Madiha S Ibrahim, Emad Elgendy, Kazuo Takahashi, Yasuo Suzuki, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, Genetic diversification of H5N1 avian influenza virus variants during replication in human airway epithelial cells. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

Yasuha Arai, Tomo Daidoji, Madiha S. Ibrahim, Kazuo Takahashi, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, Tatsuo Shioda, Kazuyoshi Ikuta, Yohei Watanabe, Identification of human adaptive mutations in the polymerase complex of H5N1 avian influenza virus in Egypt. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

Tomo Daidoji, Emad Elgendy, Yohei Watanabe, Kazuyoshi Ikuta, Takaaki Nakaya, Hemagglutinin acid stability in H7 influenza virus infection to host cells. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

Emad Elgendy, Madiha S. Ibrahim, Arai Yasuha, Tomo Daidoji, Yohei Watanabe, Takaaki Nakaya, Genetic characterization of H5N1 avian influenza virus from pigeon in Egypt 2009. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

Shoko Nakamura, Tomo Daidoji, Tomoyuki Honda, Takaaki Nakaya, Toshihisa Komori, Keizo Tomonaga, Dynamics of influenza A virus infection in mucin-type glycosyltransferase Galnt3-knockout mice. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

渡邊洋平、荒井泰葉、大道寺智、川下日理人、Madiha S. Ibrahim、平松宏明、瀧澤律子、高橋和郎、奥野良信、中屋隆明、鈴木康夫、塩田達雄、生田和良、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス Clade2.2.1 HA のヒト適応変異、第 62 回

日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

荒井泰葉、Madiha S. Ibrahim、大道寺智、高橋和郎、中屋隆明、鈴木康夫、塩田達雄、生田和良、渡邊洋平、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスポリメラーゼにおけるヒト適応変異の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

大道寺智、渡邊洋平、生田和良、中屋隆明、ヒト呼吸器上皮由来インフルエンザウイルス感受性細胞の樹立と感染実験、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

中村祥子、堀江真行、大道寺智、本田知之、中屋隆明、小守壽文、朝長啓造、ムチン型糖転移酵素 Galnt3 ノックアウトマウスを用いた A 型インフルエンザウイルス感染動態の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

渡邊洋平、PB2-627K を有する clade 2.2.1 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する HA 変異導入がヒト呼吸器上皮における複製動態に与える影響の解析、Third Negative strand virus-Japan Symposium、沖縄、2014 年 1 月

大道寺智、鳥インフルエンザウイルスに見られる pH 依存的な感染様式について、Third Negative strand virus-Japan Symposium、沖縄、2014 年 1 月

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、神戸、2013 年 11 月

大道寺智、渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim、安木真世、丸山央峰、益田泰輔、新井史人、大場誠介、本田文江、生田和良、中屋隆明、鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮細胞に対する感染メカニズム、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

中村祥子、堀江真行、安木真世、大道寺智、久野敦、奥崎大介、牧野晶子、本田知之、成松久、中屋隆明、朝長啓造、A 型インフルエンザウイルス感染におけるムチン型糖転移酵素 Galnt3 の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

渡邊洋平、エジプトにおける 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、Second Negative strand virus-Japan Symposium、沖縄、2013 年 1 月

渡邊洋平、エジプトにおける H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの多様化について、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

渡邊洋平、伊東哲男、Madiha S. Ibrahim、Hany F. Ellakany、Nongluk Sriwilaijaroen、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監視デバイス、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

大道寺智、Madiha S. Ibrahim、渡邊洋平、安木真世、丸山央峰、益田泰輔、新井史人、大場誠介、本田文江、生田和良、中屋隆明、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒト呼吸器上皮細胞に対して広いトロピズムを示す、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

Ririn Ramadhany、安木真世、中村昇太、大道寺智、渡邊洋平、高橋和郎、生田和良、中屋隆明、High-throughput amplicon sequencing analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

21 Watanabe Yohei, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Tomo Daidoji, Takaaki Nakayava, Kazuyoshi Ikuta, Antigenic Diversification of H5N1 highly Pathogenic Avian Influenza A Virus Sublineages Co-circulating in Egypt. *The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity*, Hyogo Japan, September, 2012.

22 渡邊洋平、海外流行地域における H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの多様性獲得について、第 53 回日本臨床ウイルス学会、大阪、2012 年 6 月

23 Watanabe Yohei, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Norihito Kawashita, Hiroaki Hiramatsu, Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki, Kazuyoshi Ikuta, Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their

Emergence in Birds in Egypt. *XV International Congress of Virology*, Sapporo Japan, September, 2011.

〔図書〕(計 2 件)

渡邊洋平、鳥インフルエンザウイルスの糖鎖を介したヒト適応機構とパンデミック対策、*Glycoforum, Glycomicrobiology Now* (2016)

渡邊洋平、大道寺智、中屋隆明、H5N1 鳥インフルエンザウイルス HA の宿主適応機構、*ウイルス* 65(2):187-198 (2015)

〔その他〕

ホームページ等

<http://virology.biken.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 和良 (IKUTA, Kazuyoshi)
大阪大学・医学系研究科・招へい教授
研究者番号：60127181

(2) 研究分担者

渡邊 洋平 (WATANABE, Yohei)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50452462

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80271633

鈴木 康夫 (SUZUKI, Yasuo)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00046278

高橋 和郎 (TAKAHASHI, Kazuo)
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・部長
研究者番号：10171472

(3) 連携研究者

大道寺 智 (DAIDOJI, Tomo)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80432433

(4) 研究協力者

Madiha S. Ibrahim
ダマンフル大学・獣医学部・教授