

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20406025

研究課題名 (和文) エジプトの鳥インフルエンザウイルス H5N1 の疫学調査とそのウイルス学的研究

研究課題名 (英文) Epidemiological and virological studies on avian influenza virus H5N1 in Egypt

研究代表者

生田 和良 (IKUTA KAZUYOSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：60127181

研究成果の概要 (和文) : H5N1 亜型高病原性トリインフルエンザウイルス (HPAIV H5N1) は、一部の地域において致死率の高いヒト感染例が散発的に確認され、ヒトに対してパンデミックとなる懸念が指摘されている。エジプトは現在、世界的にも多くの HPAIV 感染者を出している流行国の 1 つである。本研究においては、エジプトで飼育されている家禽から HPAIV 分離を試み、得られた遺伝子配列から分子疫学調査を実施した。その結果、エジプトに HPAIV が初めて導入された 2006 年に比べて、2008-09 年のウイルスはヒトに感染しやすいと考えられる α 2,6 SA 糖鎖親和性を獲得していた。

研究成果の概要 (英文) : Highly pathogenic avian influenza A virus (HPAIV H5N1) is currently widespread in several areas. Although the current H1N1 pandemic may have diverted attention from the continuing worldwide circulation of H5N1 virus, the pandemic threat of H5N1 is still alarming. In particular, Egypt has unexpectedly had the highest number of human cases of H5N1 infection. In this study, we conducted a molecular-epidemiological studies using H5N1 viruses isolated between 2006 and 2008-2009 in Egypt. The phylogenetic results showed that recent human isolates clustered into several new H5 sublineages. As expected, we found that these H5 sublineages have acquired an enhanced binding affinity for α 2,6 SA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス、エジプト、アレキサンドリア大学、ニワトリ、アヒル、ハト、遺伝子配列、病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 のヒトへの感染伝播例は、1997 年に香港で発生し、その後、2003 年からベトナム、中国で再び発生した。本研究開始当初は、東南アジアの各国へ、さらにヨーロッパやアフリカへも伝播が広がっており、特に、本研究が対象とするエジプトはインドネシアに次いで 2 番目にヒトへの感染例の多い国であった。エジプトでのヒトへの感染例は、死亡したニワトリ、アヒル、また野鳥への直接の接触に依っていることが明らかにされていた。

(2) エジプトにおけるヒトへの感染確認に関する情報は、エジプト衛生部、WHO H5 リファレンス実験施設であるアメリカ海軍医学研究所ユニット (NAMRU-3) から出されていたにすぎない。一方、獣医領域や野鳥に関する H5N1 感染に関して把握されている情報では、エジプトの 26 地域中の 21 地区 (80%) にまで H5N1 が広がっていることを示していた。しかし、これは大規模な農場でのアウトブレイクに関して把握されているものの情報であり、野鳥や家畜 (ニワトリ、アヒル、ハト、ブタ) に関する詳細な調査はほとんど行われていないのが現状であった。

(3) 本研究代表者は、エジプトのアレキサンドリア大学を訪問し、共同研究打ち合わせ、学長や獣医学部長との話し合いを通して、感染動物サンプルの日本への輸出に関する了解と政府との交渉手続きの了解を取り付け、アレキサンドリア大学獣医学部と大阪大学微生物病研究所との共同研究協定の締結も行った段階にあった。

2. 研究の目的

エジプトの農場および民家のニワトリとアヒルへの H5N1 感染状況をヒト型インフルエンザウイルス A/B 型および鳥インフルエンザウイルス用 (研究用に開発) のイムノクロマト法を用いて、野外迅速診断を行い、陽性例のサンプリングを行なう。陽性例は大阪大学微生物病研究所に移送し、ウイルス分離を行うとともに、その遺伝子配列情報、各種細胞への感染実験を通してウイルス学的性状を把握する。明らかになったエジプト分離株に特徴的なウイルス学的性状については、リバーズジェネティクスによりその責任遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エジプトにおける H5N1 感染調査に

関する研究体制は、主としてアレキサンドリア大学の獣医学部のネットワークを用いる。野外での H5N1 感染の診断は、ヒト型インフルエンザウイルス A/B 型および鳥インフルエンザウイルス用に開発されていたイムノクロマト法を用いて、野外迅速診断を行った。エジプトから日本への移送が許可されたものについては、冷凍下で空輸する。動物の病理標本作製については、アレキサンドリア大学獣医学部で行った。日本に移送したサンプルについては、大阪大学微生物病研究所感染症共同実験室 (P3 レベルバイオハザード対策実験室) で、ウイルス分離とそのウイルス学的性状の解析を行った。

(2) ウイルスサンプルは、2007 年 1 月から 2009 年 2 月までの間に実施した。大型の農場意外にも、民家が庭先で飼育しているものや都市部においても屋上で木製の鳥小屋でこれら鳥類を飼育している場合が多く、これらからも実施した。症状を示している、または死亡したニワトリとアヒルの上咽頭スワブ、肺と気管の計 27 サンプルを採取した。これらのうち、RT-PCR により H5N1 陽性と判定された 21 サンプルについてウイルス分離を実施した。ウイルス分離は、発育鶏卵を用いて行い、分離可能であった 20 例についてウイルスストックとした。

(3) 遺伝子配列解析は、RT-PCR、クローニング、その後それぞれにそれぞれのセグメントについて少なくとも 3 クローンのシーケンスを行うことにより決定した。

(4) リバーズジェネティクスによるウイルス産生は、Fodor et al. (J. Virol. 73: 9679-9682) により行った。本研究により得られたウイルスの HA 遺伝子と、EG/D1 (A/duck/Egypt/D1Br12/2007) 由来の他の遺伝子によるウイルスを作製した。

(5) 本研究で得られた 21 の HA 遺伝子の系統樹解析は、NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) に由来する、2006-2009 年の間にエジプトの H5N1 の 85 ウイルスの配列とともに行った。本研究で得られた 19 の NA 遺伝子についても同様に、NCBI データベースに由来する、2006-2009 年の間のエジプトの H5N1 の 65 ウイルスの配列とともに行った。

(6) ウイルスのレセプター結合の特異性は、Yamada et al. (Nature 444: 378-382) に従って、solid-phase direct binding assay 法により実施した。

(7) マウスへの感染実験は、6週齢のBALB/c マウスを用いて行った。

4. 研究成果

(1) エジプトのH5N1のHA遺伝子に関する系統樹解析を、NCBI データベース由来の85株と本研究により得られた21株の計106株について実施した。その結果、いずれも clade 2.2.1 のクラスターに局在した。しかし、幾つかの株は新たな H5 sublineage を形成していた(図1)。2006~2007年の株は全体に散在していたが、2008~2009年のヒトおよび家禽由来株はA、B (I、II)、C、Dと名付けた lineage に局在していることが明らかになった。このことは、2007年と2008年の間にエジプトのH5N1は大きな遺伝子変異が起こったことを示している。一方、NA遺伝子においては、大きな変異は認められなかった。

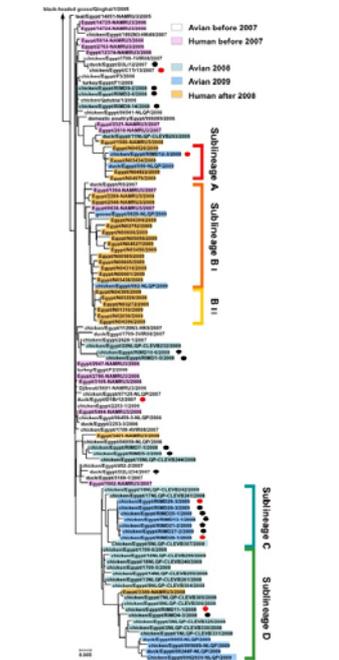


図1. エジプト由来H5N1のHA遺伝子系統樹解析。

(2) 次に、これらウイルスのレセプターへ

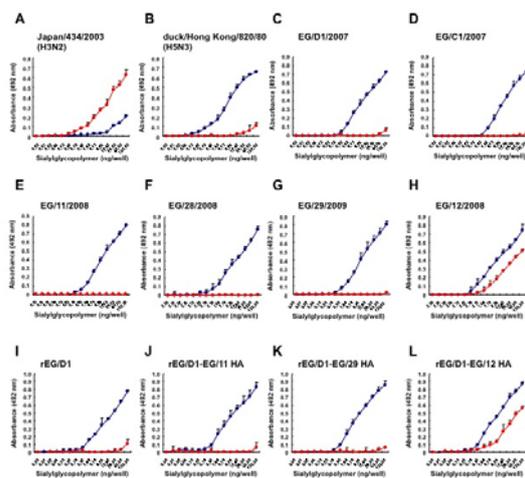


図2. エジプトのH5N1株のレセプター(トリ型 α 2,3 SAおよびヒト型 α 2,6 SA)への結合上昇に関する検討。

の結合特異性について検討した。トリ型用 SA α 2,3Gal およびヒト型用 SA α 2,6Gal sialylglycopolymer を用いた direct binding assay を行った。今回の研究で得られたウイルス株のうち6株について実施したところ、2007年の2株、2008年の1株、2009

年の2株は、 α 2,3 SA への結合性を示した。この結合パターンは、鳥インフルエンザウイルス H5N3 (A/Duck/Hong Kong/820/00) で観察されるものに近かった。一方、2008年のEG/12株 (A/chicken/Egypt/RIMD12-3/2008) は α 2,6 SA への結合性が優位に上昇していること、しかし季節性インフルエンザウイルス (A/Japan/434/2003) より高くないことが明らかになった。この点は、リバースジェネティクスで作製した rEG/D1 の結合性から、この特異性はEG/12株のHAの性状に依っていることが判明した。

(3) そこで、多くのヒトからの分離株が属するAおよびB sublineageに着目して、この α 2,6 SA への結合上昇に原因となっている変異領域について検討した。本研究の上記6株に加えて、エジプト株のデータベース由来のHA遺伝子配列を比較し、sublineage A由来HA内のアミノ酸置換 Q196H および S239P (H3の残基で) を同定した。そこで、EG/D1 HAへのQ196H置換を導入したところ、優位に α 2,6 SA への結合上昇が認められた。しかし、S239Pではごくわずかの上昇が認められすぎなかった。また、両置換を行った場合にも相乗効果は認められなかった。一方、sublineage BIの19 H5N1株のHAの検討により、S125N、133 deletion、I155Tが同定され、同様にEG/D1 HAへの導入を試みたところ、これら単独では α 2,6 SA への結合上昇は認められなかったが、133d/I155Tの導入により優位な上昇が認められた。また、sublineage BIIでは、BIで同定された3アミノ酸変異加えて、V214Iが同定され、同様な遺伝子変異導入を行ったところ、わずかに α 2,6 SA への結合上昇が観察された。

(4) 今回明らかになった上記のQ196Hおよび133d/I155Tは、エジプトのヒト由来株では認められなかったため、エジプトの家禽で出現しているものと考えられた。そこで、ヒトの喉頭、気管、肺胞部への結合性を免疫染色法により行ったところ、肺胞部のtype II pneumocyteに強い結合性が認められた。喉頭や気管部への結合性は、季節性インフルエンザ (H3N2) に比べて弱かった。

(5) 次に、 α 2,6 SA への結合上昇が認められた上記HAの変異について、感染複製への影響について検討した。その結果、これらの変異に関わらず、ニワトリの繊維芽細胞においては変化が認められずに高い増殖性が観察された。しかし、human small airway epithelial cells (SAEC)における増殖性は、これらの変異導入株では優位に高い増殖性を示した。

(6) マウスへの鼻腔感染実験を行ったところ、上記変異を導入したウイルスは優位に高い病原性を示した。

(7) 以上の成果により、エジプトにおいて、

2007-2008 のアウトブレイク中に大きなウイルス HA 遺伝子における変異が起こっていること、この変異はエジプトにおけるヒトへの感染上昇が起こり始めるよりやや先に起こっていることが明らかになった。しかし、ヒト分離株では同様な変異は認められていないことから、人への感染はさらに別の変異が必要と考えられた。

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 13 件)

- ① Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Kawashita N, Mizuike R, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Takagi T, Suzuki Y, Ikuta K. 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, in press
- ② Ibrahim MS, Watanabe Y, Ellakany HF, Yamagishi A, Sapsutthipas S, Toyoda T, Abd El-Hamied HS, Ikuta K. Host-specific genetic variation of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1). Virus Genes, 査読有, in press
- ③ Mizuike R, Sasaki T, Baba K, Iwamoto H, Shibai Y, Kosaka M, Kubota-Koketsu R, Yang C-S, Du A, Sakudo A, Tsujikawa M, Yunoki M, Ikuta K. Development of two types of rapid diagnostic test kits to detect the hemagglutinin or nucleoprotein of the swine-origin pandemic influenza A virus H1N1 Clin. Vaccine Immunol., 査読有, 18 (2011), 494-499
- ④ Kanai Y, Chittaganpitch M, Nakamura I, Li GM, Bai GR, Li YG, Ikuta K, Sawanpanyalert P. Distinct propagation efficiencies of H5N1 influenza virus Thai isolates in newly established murine respiratory region-derived cell clones. Virus Res., 査読有, (2010), 153, 218-225
- ⑤ Pitaksajjakul P, Lekcharoensuk P, Uparagarin N, Barbas CF, 3rd, Ibrahim MS, Ikuta K, Ramasoota P. Fab MAbs specific to HA of influenza virus with H5N1 neutralizing activity selected from immunized chicken phage library. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, (2010), 395, 496-501
- ⑥ Li YG, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Kanai Y, Bai GR, Kameoka M, Takeda N, Ikuta K, Sawanpanyalert P. Characterization of H5N1 influenza viruses isolated from humans

in vitro. Virological J., 査読有, (2010), 7, 112

- ⑥ Yamashita A, Kawashita N, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Watanabe Y, Ibrahim MS, Ideno S, Yunoki M, Okuno Y, Takagi T, Yasunaga T, Ikuta K. Highly conserved sequences for human neutralization epitope on hema. gglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human monoclonal antibody recognition. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, (2010), 393, 614-618
- ⑦ Ueda M, Daidoji T, Du A, Yang CS, Ibrahim MS, Ikuta K, Nakaya T. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. J. Virol., 査読有, (2010), 84, 3068-3078
- ⑧ Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. PLoS One, 査読有, (2009), 4, e4219
- ⑨ Sakudo A, Baba K, Tsukamoto M, Sugimoto A, Okada T, Kobayashi T, Kawashita N, Takagi T, Ikuta K. Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus. Bioorg. Med. Chem., 査読有, (2009), 17, 752-757
- ⑩ Du A, Daidoji T, Koma T, Ibrahim MS, Nakamura S, de Silva UC, Ueda M, Yang CS, Yasunaga T, Ikuta K, Nakaya T. Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, (2009), 378, 197-202
- ⑪ Sakudo A, Ikuta K. Efficient capture of infectious H5 avian influenza virus utilizing magnetic beads coated with anionic polymer. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, (2008), 377, 85-88
- ⑫ Daidoji T, Koma T, Du A, Yang CS, Ueda M, Ikuta K, Nakaya T. H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells. J. Virol. 査読有, (2008), 82, 11294-11307
- ⑬ Ueda M, Yamate M, Du A, Daidoji T, Okuno Y, Ikuta K, Nakaya T. Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. Virus. Res., 査読有, (2009), 136, 91-97

〔学会発表〕(計13件)

- ①Ikuta K, Development of Diagnostic and Therapeutic Products of Murine and Human Monoclonal Antibodies against Influenza Virus, 3rd International Conference of Virology, Egyptian Society of Virology, 24-25 Nov, 2010, Cairo, Egypt
- ②渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim, 川下理日人、Hany F. Ellakany, Nongluk Sriwilaijaroen, 平松宏明、鈴木康夫、生田和良、エジプトで流行するH5N1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親和性獲得に関する変異、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島
- ③Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Abd El-Hamid HS, Ikuta K, Evolutionary Dynamics of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 in Egypt, 2nd Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 17 April, 2010
- ④渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, 生田和良、アヒル固体内臓器で選択されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25-27日、東京
- ⑤Madiha S. Ibrahim, 渡邊洋平、生田和良、Propagation-Specific Sequence Changes of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses, The 57th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, 2009年10月25-27日、東京
- ⑥Ikuta K, Preparation of influenza virus-specific human monoclonal antibodies showing broad neutralization activity, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.
- ⑦Okuno Y, Development of Pre-pandemic

Vaccines for Pandemic Influenza in Japan, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.

⑧Takahashi K, Development of rapid diagnosis test for avian influenza viruses, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.

⑨Nakaya T, H5N1 Avian Influenza Virus Induces Apoptotic Cell Death in Mammalian Airway Epithelial Cells, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.

⑩Ibrahim MS, Molecular Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses from Egypt, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.

⑪Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Abd El-Hamid HS and Ikuta K, Intra-species shifts of H5N1 Highly Pathogenic Influenza Viruses, Joint Scientific Forum on Avian Influenza, Alexandria, Egypt, 12 Nov, 2008.

⑫Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany、渡邊洋平、生田和良、Molecular Characterization of highly Pathogenic Avian Influenza Viruses (H5N1) from Egypt, 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山

⑬渡邊洋平、Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, 生田和良、H5N1鳥インフルエンザに感染した家禽固体内におけるウイルス遺伝子変異の解析、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山

〔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・微生物病研究所・教授
研究者番号：60127181

(2) 研究分担者

作道 章一 (SAKUDO AKIKAZU)
琉球大学・医学部保健学科・助教
研究者番号：10397672

中屋 隆明 (NAKAYA TAKAAKI)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80271633

高橋 和郎 (TAKAHASHI KAZUO)
大阪府立公衆衛生研究所・副所長
研究者番号：10171472

(3) 連携研究者

奥野 良信 (OKUNO YOSHINOBU)
(財)阪大微生物病研究会・観音寺研究所・
所長
研究者番号：30112064

纈纈 律子 (KOKETSU-KUBOTA RITSUKO)
(財)阪大微生物病研究会・研究員
研究者番号：80467521
(H21 まで分担者として参画)

渡邊 洋平 (WATANABE YOHEI)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：50452462
(H21 年から参画)

佐々木 正大 (Sasaki Tadahiro)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：20547533
(H21 年から参画)

Madiha S. Ibrahim
アレキサンドリア大学・獣医学部・講師