

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590118

研究課題名 (和文) 高病原性鳥インフルエンザウイルスの薬剤耐性機構の解明

研究課題名 (英文) Research of drug-resistant mechanism in highly pathogenic avian influenza virus

研究代表者

田川 (坂井) 優子 (SAKAI-TAGAWA YUKO )

東京大学 ・ 医科学研究所 ・ 助手

研究者番号：40178538

研究成果の概要 (和文)：

高病原性鳥インフルエンザウイルスが発生しているベトナムやインドネシアの患者や動物の検体中のウイルスを解析することによって、以下の知見を得た。

- ① ベトナムの患者から薬剤耐性ウイルスが分離されたが、新規薬剤が効果的である。
- ② インドネシアのブタには H5N1 が蔓延しており、ヒトへの伝播の温床となる可能性がある。
- ③ ヒトの病原性に関わる変異は患者体内で生じているが、分離によって選択されてしまう恐れがある。
- ④ 多くの市販の迅速診断キットは H5N1 の検出も可能である。

研究成果の概要 (英文)：

The persistence of H5N1 avian influenza viruses in many Asian countries and their ability to cause fatal infections in humans have raised serious concerns about a global flu pandemic. We obtained important results as below:

- ① Oseltamivir-resistant H5N1 viruses have been isolated from oseltamivir-treated patients. The investigational drug T-705 has effectively protects mice from lethal infection with these viruses.
- ② H5N1 viruses have been transmitted to pigs on multiple occasions in Indonesia.
- ③ A direct analysis of the viral RNAs of H5N1 viruses in patients revealed that efficient virus propagation in the human. Viruses grown in culture or eggs did not always reflect those in patients.
- ④ Many influenza rapid diagnostic tests are available for the detection of H5N1 influenza virus infections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザウイルス・薬剤耐性・抗インフルエンザ薬・迅速診断・病原性

## 1. 研究開始当初の背景

2003年以来、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1がアジア各国で流行し、多くの感染者が確認され、そのうちの6割以上が死亡している。現在までは鳥からヒトへの感染例のみで、ヒトからヒトへの大規模な蔓延は起こっていないが、遺伝子の突然変異や遺伝子再集合によって、ヒトからヒトへの感染を始める可能性は大いにある。鳥インフルエンザウイルスはパンデミックを起こす新型インフルエンザの先駆けになり得るので、厳重な警戒態勢が必要である。人類は前世紀、三度のパンデミックを経験し、多くの貴重な人命の損失のみならず経済的な打撃も受けた。現代ではひとたび新型インフルエンザが発生すれば、高度に発達した交通機関により、瞬く間に世界中に広がり、多くの犠牲者が出る事が予想される。これに対して、我々は情報網の発達や医療技術の向上によって対応する必要がある。医療技術の向上の中には、診断技術の開発や予防ワクチンの開発、抗インフルエンザ薬の開発が含まれる。そのうちの抗インフルエンザ薬は近年開発され、すでに臨床でその有効性が評価されている。しかし、M2阻害薬であるアマンタジンの例にあるようにウイルスは耐性の獲得という手段を講じてくる。現にベトナムで多くの犠牲者を出している高病原性鳥インフルエンザウイルスはすでにアマンタジンに耐性であることが確認されている。そこでアマンタジンとは作用機序の違うノイラミニダーゼ阻害薬であるオセルタミビルを治療に使用する必要がある。オセルタミビルは臨床的に耐性ウイルスが出にくい薬剤であるとされているが、我々は日本において流行期に使用されたオセルタミビルによって、季節性のH3N2、H1N1インフルエンザウイルスのなかに、すでに耐性を持つものを高頻度に検出している。

高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1もオセルタミビル耐性を獲得する可能性があり、そのサーベイランスを行う必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスがアジアを中心に蔓延し、多くの感染者が死亡している。インフルエンザ治療に効果的なオセルタミビルはH5N1鳥インフルエンザ治療にも適用されているが、H5N1が変異を獲得してヒト-ヒト感染による大規模蔓延を起こしたときには薬剤耐性の出現は脅威となる。そこで、このウイルスがヒトに蔓延しないような対策や新規抗ウイルス剤の開発に必要な情報を得ることを目的として、オセルタミビルを投与さ

れた高病原性鳥インフルエンザ感染患者の検体からウイルスを分離し、耐性変異を持つウイルスの探索を行い、遺伝学的または生物学的な性状を詳しく解析し、高病原性トリインフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体の輸入

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスが蔓延し多数の感染患者の出ているベトナムおよびインドネシアより感染患者の検体及び患者発生周辺地域の感染動物検体を輸入する。(農林水産省の輸入禁止品輸入許可申請)なお、患者および感染動物の検体の採取部位や病歴、発生地域などの情報も収集した。

### (2) ウイルス分離

細胞及び発育鶏卵を用いて、検体よりウイルスを分離した。高病原性鳥インフルエンザウイルスはBSL3の病原性微生物であり、その取り扱いにはP3実験室において行った。分離したウイルスは遺伝子の解析やウイルスの性状解析に使用した。

### (3) ウイルス遺伝子解析

分離したウイルスのRNAから逆転写した後、各遺伝子特異的プライマーを使用してPCRを行い、遺伝子の塩基配列を決定した。

なお、患者体内における耐性変異の出現頻度は低く、その存在比は低い可能性があり、分離したウイルスでは選択的に耐性変異が排除されてしまう可能性がある。そこで、検体から直接ウイルスRNAを抽出し、RT-PCRを行い、そのPCR産物をクローニングした後、複数のクローンの塩基配列を解析することによって、存在比の低い耐性変異を検出することとした。

### (4) 性状解析

分離したウイルスは、さまざまな細胞におけるウイルス増殖能や薬剤に対する感受性、レセプター特異性などの解析を行った。

### (5) 動物実験

ヒトのインフルエンザ感染モデル動物であるフェレットを用いて、薬剤耐性ウイルスの生体内での増殖能の比較や薬剤感受性の検討を行った。

また、高病原性鳥インフルエンザウイルスの哺乳類における病原性を解析するために、マウス、ダチョウ、カニクイザルなどに感染させウイルス学的ならびに病理学的解析を行った。

#### (6) 迅速診断キットの検定

2009年時点において我が国で販売されていた20種類の迅速診断キットについて、サブタイプや年代、クレードの異なるインフルエンザウイルスを希釈し、どこまで検出可能か否かを比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ベトナムにおけるH5N1感染

ベトナムでは2003年に初めてヒトでの感染が確認されて以降、多数の死亡例が報告された。我々は禁止品の輸入許可申請の上、ベトナムから感染患者の検体を輸入した。2004年から2010年までに13回検体の送付があり、分離作業の結果、31株を得た。これらのウイルスのオセルタミフル耐性に関わるNA遺伝子の解析の結果、1株から耐性変異を検出した。この耐性ウイルスは細胞培養における薬剤感受性は耐性を示したが、ウイルス増殖性が低下しており、塩基配列解析の結果、NA274番目のヒスチジンがチロシンに変異していた。

ベトナムの患者から薬剤耐性変異は1例のみであったが、分離したウイルスのすべての遺伝子の塩基配列を解析し、ヒトで伝播しやすい変異(PB2蛋白質627番目、701番目)を持つものが検出され、マウスにおける病原性に違いがあることを確認した。

##### (2) インドネシアにおけるH5N1感染

インドネシアでは2003年からヒトへの感染例が頻発し、世界最多の感染死亡者数が報告されているが、インドネシア政府の方針で感染患者の検体やウイルスの輸出は制限されている。ごく初期に得られたヒトの数検体のうち1検体からウイルスを分離することが出来た。

H5N1は鳥由来のウイルスであるが、ブタで流行を繰り返すと、ヒトで効率よく伝播するようなウイルスに変化する可能性がある。そこでブタにこのウイルスが蔓延していないかサーベイランスを行い、また、伝播しやすいような変異を獲得していないかを解析した。その結果、インドネシアにおいてブタは何ら症状を示さずにH5N1ウイルスに感染していることが示された。系統樹解析の結果から、遺伝的に異なるウイルスが鳥からブタへ複数回独立して伝播していることがわかった。また、ブタから得られたウイルスの中にはヒト型レセプターを認識する変異を有しているものもあり、ヒトへの蔓延の可能性を含むものであり、今後も監視が必要である。

##### (3) 病原性に関する変異の解析

現在、高病原性鳥インフルエンザウイルスによるヒトへの感染は限局的であるが、ウイ

ルスが変異することによってヒト-ヒト感染による大規模蔓延を起こしたときには薬剤耐性の出現は脅威となる。薬剤耐性変異の監視だけではなく、ヒトに容易に感染しやすくなる変異や強い病原性をもたらす変異の監視及びその解析も重要であると考えた。

哺乳類における病原性に関わる変異としてPB2蛋白質の627番目と701番目が重要であることが知られているが、さまざまな部位から採取された患者の検体を直接、RT-PCRシクローンの塩基配列を解析することによって、ウイルスは患者体内ですでにこれらの変異を獲得していることがわかった。また、これらの変異は細胞や発育鶏卵で分離作業を行う事によって、選択されてしまう恐れがある事が示された。また、ダチョウの細胞においてウイルスを継代するうちに患者体内での変異と同様に627番目や701番目の変異が増大していく可能性が示された。

患者検体中のウイルスの解析によって、PB2だけではなくレセプター特異性に関わるHAにおいても、患者体内で変異が生じていることもわかった。

##### (4) H5N1ウイルスの迅速診断

季節性インフルエンザの治療には早期に抗ウイルス剤を用いることが有効であることが分かっている。早期の治療のためには簡便に迅速に診断する必要があるため、迅速診断キットが多用されている。2009年時点、国内で20種類の迅速診断キットが販売されていたが、これらは高病原性鳥インフルエンザH5N1を判定可能か検定した。ベトナムおよびインドネシアから輸入し分離したウイルスを含む、16株のH5N1ウイルスを同じ感染価にそろえた後、希釈し、同じ容量で20種類のキットの説明書に従って判定した。A型インフルエンザウイルスであるH5N1ウイルスは迅速診断キットでは判定可能であるが、キットによってはウイルス量が少ない場合に判定できないものがあることが分かった。

##### (5) 新規薬剤の効果

オセルタミビルに対する薬剤耐性変異はベトナムの少女の検体から得られた1例だけであったが、このウイルスについてオセルタミビルとは違う作用機序の新規抗インフルエンザ薬T-705の効果のマウスにおいて確認した。T-705はインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼによる遺伝子複製を阻害するが、宿主細胞に対する毒性が低く、ウイルスに対する高い選択性が認められている。マウスを殺す十分な量のH5N1ウイルスを感染させた後、300mg/kgで1日2回8日間投与することによって、100%正残した。

オセルタミビル耐性ウイルスや耐性変異を導入したウイルスに対しても効果があることが確認された。また、ウイルス接種後、72時間に投与を開始した場合でも100%生残り、臨床応用に有用となる可能性が示唆された。

#### 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 15 件)

以下すべて査読有り

1. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Sero-prevalence of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus among Schoolchildren and Their Parents in Tokyo, Japan. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Feb 23. 査読有
2. Nidom CA, Takano R, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Daulay S, Aswadi D, Suzuki T, Suzuki Y, Shinya K, Iwatsuki-Horimoto K, Muramoto Y, Kawaoka Y. Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg Infect Dis*. 2010 Oct;16(10):1515-23. 査読有
3. Imai H, Shinya K, Takano R, Kiso M, Muramoto Y, Sakabe S, Murakami S, Ito M, Yamada S, Le MT, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Takahashi K, Omori Y, Noda T, Shimojima M, Kakugawa S, Goto H, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog*. 2010 Sep 16;6(9). pii: e1001106. 査読有
4. Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Ozawa M, Watanabe T, Sakabe S, Li C, Kim JH, Myler PJ, Phan I, Raymond A, Smith E, Stacy R, Nidom CA, Lank SM, Wiseman RW, Bimber BN, O'Connor DH, Neumann G, Stewart LJ, Kawaoka Y. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog*. 2010 Aug 5;6(8). pii: e1001034. 査読有
5. Le QM, Ito M, Muramoto Y, Hoang PV, Vuong CD, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Ozawa M, Takano R, Kawaoka Y. Pathogenicity of highly pathogenic avian H5N1 influenza A viruses isolated from humans from 2003 to 2008 in Northern Vietnam. *J Gen Virol*. 2010 Oct;91(Pt 10):2485-90. Epub 2010 Jun 30. 査読有
6. Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Tamura D, Le MQ, Nidom CA, Sugaya N, Kawaoka Y. Sensitivity of influenza rapid diagnostic tests to H5N1 and 2009 pandemic H1N1 viruses. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug; 48(8):2872-7. Epub 2010 Jun 16. 査読有
7. Tamura D, Fujino M, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto K, Goto H, Sakai-Tagawa Y, Horimoto T, Nirasawa M, Kawaoka Y. Significance of seasonal influenza viruses in the stool of pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Jun;29(6):578-9. No abstract available. 査読有
8. Kiso M, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Shinya K, Sakabe S, Le QM, Ozawa M, Furuta Y, Kawaoka Y. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12;107(2):882-7. 査読有
9. Shiraishi K, Mitamura K, Ozawa M, Kakugawa S, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Sugaya N, Kawaoka Y. Mutations in influenza A virus during amantadine-oseltamivir combination therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 ;5 : 243-248 査読有
10. Shinya K, Makino A, Ozawa M, Kim JH, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Le QM, Kawaoka Y. Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus possessing mammalian-type amino acids in the PB2 protein. *J Virol*. 2009 Dec;83(24):13015-8. Epub 2009 Sep 30. 査読有

11. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 2009 Aug 20;460(7258):1021-5. 査読有
12. Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Macken C, Kawaoka Y. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology*. 2009 Jul 20;390(1):13-21. Epub 2009 May 23. 査読有
13. Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia. *Arch Virol*. 2009;154(4):677-81. Epub 2009 Mar 14. 査読有
14. Le QM, Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Ito M, Kawaoka Y. Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *J Virol*. 2009 May;83(10):5278-81. Epub 2009 Mar 4. 査読有
15. Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Mai LQ, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine*. 2008 Nov 25;26(50):6398-404. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Le QM Pathogenicity of highly-pathogenic avian H5N1 influenza A viruses isolated from humans during 2003 to 2008 in Northern Vietnam Options for the Control of Influenza VII 5-6 September,2010 Hong Kong SAR,China
2. 今井博貴 H5N1 インフルエンザウイルス高病原性発揮のメカニズム 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会 2010/11/8 徳島市あわぎんホール
3. 坂井(田川)優子 感染患者体内における H5N1 鳥インフルエンザウイルスの変異 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 2008/10/28 岡山コンベンションセンター
4. 村本裕紀子 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスのサルにおける病原性の比較 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 2008/10/28 岡山コンベンションセンター
5. 村上晋 H5N1 不活化インフルエンザワクチンのクレード間交差防御免疫能の解析 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 2008/10/28 岡山コンベンションセンター
6. 高野量 インドネシアのブタから分離された H5N1 インフルエンザウイルスの性状解析 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 2008/10/28 岡山コンベンションセンター
7. 山田晋也 H5N1 インフルエンザウイルスの正常ヒト呼吸器上皮細胞における増殖性に関する変異 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会 2008/10/28 岡山コンベンションセンター

[その他]  
ホームページ  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/virology/index.html>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
坂井(田川)優子 (SAKAI-TAGAWA YUKO)  
東京大学・医科学研究所・助手  
研究者番号：40178538

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：