

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791134

研究課題名(和文)高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1由来新型株出現機構に関する基礎研究

研究課題名(英文)Basis research in evolutionary mechanism of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses

研究代表者

渡邊 洋平(Watanabe, Yohei)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50452462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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の感染地域の1つであるエジプトにおいて、当該ウイルスが獲得するウイルス遺伝子変異を探索した。その結果、同地域にて近年流行している特定のsublineageウイルス群がHemagglutininに共通したアミノ酸変異を獲得していることが明らかとなった。H5N1ウイルスは、当該変異を獲得することで、これよりも高いヒト型レセプター糖鎖結合親和性を獲得し、より少ないウイルス量でヒトに感染を成立できるように変化している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have searched mutations that H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses acquired during their dissemination in Egypt. The results showed that specific sublineage viruses in Egypt have acquired HA mutations that enhanced their human-type receptor binding affinity. The mutations also conferred a higher virulence in the infected mice. Our finding suggested that H5N1 viruses could acquire mutations that increase the infectivity toward humans during their transmission in birds.

研究分野：ウイルス学

キーワード：国際感染症 ウイルス学 人獣共通感染症 インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスが自然宿主である鳥類からヒトに感染域を変化させるためには、レセプターであるシアロ糖鎖への親和性がトリ型からヒト型に変化する必要がある。H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス(以下、H5N1 ウイルス)は、現在、アジア・アフリカ地域で広範に蔓延している。H5N1 ウイルスは、濃厚接触によって鳥からヒトに感染し、致死率が約 60%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。H5N1 ウイルスは、未だにトリ型レセプター糖鎖に高い親和性を示したままであるが、継続的なウイルス伝播の過程で、これまでより高いヒト型レセプター糖鎖親和性を獲得する可能性が懸念されている。

(2) 国際的な感染制御の観点から考慮すると、特に現在までヒト感染事例の多いインドネシアとエジプトに蔓延する H5N1 ウイルスの調査が急要である。インドネシアについては、わが国を含め、世界中の多くの研究グループが以前から参入して共同研究が展開されている。一方、エジプトについては、これまでそのような目的で共同研究が実施された経緯はなく、また国際的な感染症リスク共有化も十分図られていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、先行研究において構築したエジプト研究機関との連携によって、エジプトで蔓延する H5N1 ウイルスを対象に、その性質を遺伝子学的、糖鎖学的、ウイルス学的に解析することで、H5N1 ウイルスのヒトへの感染性獲得メカニズムを解明することを目的とする。

(2) エジプトで蔓延する H5N1 ウイルスの進化動態を包括的に捉えることで、同国における H5N1 ウイルスによるヒト感染のリスク評価を実施する。

3. 研究の方法

(1) 申請者らがこれまでに構築しているエジプトアレキサンドリア大学との連携によって、同国の鳥類における H5N1 ウイルス感染サンプルを採取した。

(2) 農水省の許可を受けて日本に移送した H5N1 ウイルスサンプルから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。

(3) ウイルス遺伝子配列に基づき Neighbor-Joining 法による系統樹解析を実施することで、エジプトでの H5N1 ウイルス進化動態を把握した。

(4) ヒト感染事例が頻繁に報告されるウイル

ス系統発生を検索し、共通して獲得されるウイルス遺伝子配列を同定した。

(5) リバースジェネティクス法によって変異導入組み換えウイルスを作出し、下記のウイルス性状変化に与える影響を多角的に評価した。

Sialylglycopolymer を用いた Direct binding assay によって変異がシアロ糖鎖結合親和性に与える影響を解析した。

不活化した変異ウイルスを FITC ラベルして、ヒト呼吸器組織切片上に吸着させる Virus histochemistry 法によって、変異がヒト呼吸器上皮吸着性に与える影響を解析した。

変異ウイルスを初代ヒト呼吸器上皮細胞に感染させ、培養上清中に放出される子孫ウイルス量を Focus-forming assay 法によって定量解析した。

変異ウイルスをマウスに感染させ、継続的に体重減少と致死率を観察すると共に、肺中のウイルス量を Focus-forming assay で測定した。また、採材したマウス肺について、HE 染色とウイルス抗原に対する免疫組織化学を実施して、肺における病理像を観察した。

4. 研究成果

(1) エジプトで蔓延する H5N1 ウイルスの HA 遺伝子を対象に系統樹解析を実施したところ、2008 年以降、エジプトでは異なる複数の sublineage (A/B/C/D) が同時発生していることが明らかとなった。

(2) 2008 年以降に報告されたヒト感染事例は、一例を除き全て sublineage A/B に属するウイルスによって引き起こされていた。

(3) sublineage A/B ウイルス群は、それぞれ Q192H または 128A/I155T 変異を共通して獲得していたことから、当該変異を導入した組換えウイルスを作出してレセプター糖鎖親和性を評価したところ、これまでよりも高いヒト型レセプター糖鎖親和性を獲得していることが明らかとなった。

(4) sublineage A/B ウイルスは、ヒト呼吸器組織切片を用いた virus histochemistry によって、下部呼吸器上皮にこれまでよりも高い吸着性を獲得していた。

(5) sublineage A/B ウイルスは、マウス感染モデルを用いた解析により、より少ないウイルス量で感染を成立させることが明らかとなった。

(6) sublineage A/B ウイルス群に特徴的な Q192H または 128A/I155T 変異は鳥分離株

からも検出されていることから、当該変異は鳥類間伝播の過程で選択された後、より効率的にヒトに感染伝播することで、ヒト感染事例において高頻度に検出されたと考えられた。

(7) これら(2)–(6)の結果は、H5N1 ウイルスが鳥類間伝播の過程において、ヒト型糖鎖親和性を獲得しうることを世界で初めて示しており、継続的なウイルス蔓延によって、パンデミック化の潜在性の高い変異ウイルスが出現する潜在性を提起した。

(8) 一方で、家きんに対するワクチネーションが実施された大規模農場を中心として検出される sublineage C/D ウイルス群は、抗原エピトープ部位に多くのアミノ酸変異を獲得している特徴があった。

(9) sublineage C/D 群のウイルスは、エジプトに導入直後の親株および同時流行している sublineage A/B 群とは、免疫学的に交差しないことが明らかとなった。

(10) これら(8)–(9)の結果は、不適切なワクチネーションの結果、sublineage C/D 群が形成された事を示唆すると共に、エジプトでは単一抗原を用いたワクチンを使用しても感染防御できない可能性が高いことを示した。

(11) H5N1 ウイルスは、感染アヒル個体内における複製過程において、遺伝子多様性を獲得していた。対照的に、感染ニワトリ個体内では遺伝子的な多様性は検出されなかった。このことは、感染する鳥類種の違いによって、H5N1 ウイルスが獲得する遺伝子変異や進化動態が異なる可能性を示唆した。

(12) エジプトに H5N1 ウイルスが侵入してから約 8 年が経過する間に、ウイルスが急速に遺伝的・ウイルス学的な多様性を獲得していることが明らかとなり、継続的なウイルス伝播がウイルス進化に与える影響の大きさを示している。これらの知見は、早期にエジプトにおいて H5N1 ウイルス感染を制御する緊急性を提起しており、世界的な鳥インフルエンザに対する公衆衛生に重要な情報となっている。

(13) 今後も、エジプトにおける H5N1 ウイルスを対象としたモニタリングや進化動態の把握を継続的に実施する必要性があると考えられた。本研究課題の実施によりさらに強化されたエジプト研究機関との連携体制を維持することで、同国で蔓延する H5N1 ウイルスについての国際共同研究を継続する計画である。

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 6 件)

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

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, Ekkakany 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: 368-368. doi: 10.1007/s11262-011-0583-y

[学会発表](計 10 件)

渡邊洋平, 荒井泰葉, 大道寺智, 川下日理人, Madiha S. Ibrahim, 平松宏明, 瀨藤律子, 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 Clade 2.2.1 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

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

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ータベース、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

Watanabe Yohei, Madiha S. Ibrahim, Hany F. Ellakany, Tomo Daidoji, Takaaki Nakayaya, 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.

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

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.

〔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

渡邊 洋平 (WATANABE, Yohei)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：50452462

(2) 連携研究者

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

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

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

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