

全ゲノム増幅法を用いた  
A 型インフルエンザウイルスの分子疫学

平成 25 年度

井 上 恵 美

**A novel RT-PCR that amplifies the entire genome of influenza A virus was used to determine its molecular epidemiology**

**SUMMARY**

Influenza A virus is an important zoonotic pathogen widely distributed in a variety of animal species. Each gene segment of the pandemic strain originates from duck influenza viruses. To determine features of viruses present in the field, a simple RT-PCR method that amplifies the eight genomic segments of the influenza A virus was designed. We conducted surveillance studies for avian influenza among migrating birds in Hokkaido, Japan. We also conducted a retrospective analysis of a pandemic that occurred at our university from September to December 2009. Using a single primer set, we amplified the eight genomic segments of the influenza A virus, enabling identification of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) subtypes as well as defective interfering RNA. A variety of influenza A subtypes were found to have infected migrating birds in Hokkaido; these were genetically related to the Eurasian lineage of avian viruses. An H5N1 virus isolated in 2008 from a duck in Hokkaido was thought to be avirulent and unlikely to pose a risk to humans. Phylogenetic analyses revealed that 70 strains isolated during a pandemic at our university could be classified into either three or two groups based on the HA or NA gene, respectively. We found that two epidemics among students were caused by viruses from different groups. An NA-deficient virus, which could efficiently replicate in cultured cells, was detected among the 70 strains isolated from students at our university. Because no existing drug is effective against such a mutated virus, extensive surveillance is necessary to enable clinicians to determine the most appropriate prophylactic and therapeutic regimens. The simple RT-PCR method we developed is valuable for surveillance studies, functional analyses, and practical uses such as vaccine production.

## 略語集

A (H1N1) pdm09: 2009 pandemic H1N1 influenza virus

AMV: avian myeloblastosis virus

bp: base pair

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary DNA

DI: defective interfering

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

dN: number of nonsynonymous substitution

dS: number of synonymous substitution

EDTA: ethylenediamine-N, N, N, N'-tetraacetic acid

F: fusion

Gal: galactose

HA: hemagglutinin

HPAI: highly pathogenic avian influenza

IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration

IPTG: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kb: kilobase

LB: lysogeny broth

M: matrix

MDCK: Madin-Darby canine kidney

MOI: multiplicity of infection

4-MU-NeuSAc: 4-methyl umbeliferyl-*N*-acetylneuraminic acid

NA: neuraminidase

N-J: neighbor-joining

NP: nucleoprotein

NS: non-structure

PA: polymerase acetic protein

PB1: polymerase basic protein 1

PB2: polymerase basic protein 2

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PFU: plaque forming unit

RNP: ribonucleoprotein

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SA: sialic acid

SDS: sodium dodecylsulfate

TNF  $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

Tris: 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

vRNA: viral RNA

WHO: World Health Organization

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

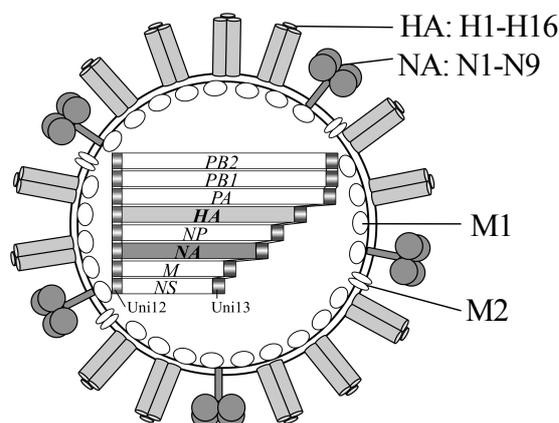
## 目次

序論.....	1
本論.....	5
第1章 A型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発と応用.....	5
第1節 A型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発と亜型判別法への 応用.....	5
1) 緒言.....	5
2) 材料及び方法.....	7
3) 結果.....	12
(1) A/Aichi/2/1968 (H3N2) 全ゲノムの増幅.....	12
(2) 異なる NA 亜型ウイルスの全ゲノム増幅.....	14
(3) 欠陥干渉 RNA 分節の検出.....	15
4) 考察.....	16
第2節 全ゲノム増幅法及び新規亜型判別法を用いた鳥インフルエンザウイルス の分子疫学.....	18
1) 緒言.....	18
2) 材料及び方法.....	21
3) 結果.....	26
(1) 2007-2012年に北海道内で分離された鳥インフルエンザウイルスの 亜型判別.....	26
(2) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA 遺伝子の系統進化解析と アミノ酸の比較.....	27
(3) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) のトリプシン依存性増殖.....	30
(4) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の NS 遺伝子の系統進化解析と アミノ酸の比較.....	30
(5) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の PB1, PB2, PA, NP, NA 及び M 遺伝子の系統進化解析とアミノ酸の比較.....	33
4) 考察.....	40

第2章 北海道医療大学における新型 H1N1 インフルエンザウイルスの分子疫学	42
第1節 本学クリニックで分離された新型 H1N1 インフルエンザウイルス HA 及び NA 遺伝子の系統進化解析	42
1) 緒言	42
2) 材料及び方法	45
3) 結果	47
(1) ウイルス分離	47
(2) HA 遺伝子の系統進化解析	49
(3) NA 遺伝子の系統進化解析	50
(4) HA1 のアミノ酸変異	52
(5) NA のアミノ酸変異	54
4) 考察	56
第2節 NA に欠損を有する新型 H1N1 インフルエンザウイルスの性状解析	59
1) 緒言	59
2) 材料及び方法	60
3) 結果	62
(1) 本学クリニックで分離された新型 H1N1 インフルエンザウイルスの オセルタミビルに対する感受性	62
(2) NA 遺伝子欠損株の検出	63
(3) プラーク純化株と親株の NA 阻害剤に対する感受性の比較	66
(4) NA 欠損クローンの MDCK 細胞における増殖	67
(5) NA 欠損クローンのニワトリ赤血球からの遊出	68
(6) NA 欠損クローンのペラミビル存在下における増殖	69
4) 考察	71
総括	73
謝辞	74
引用文献	75

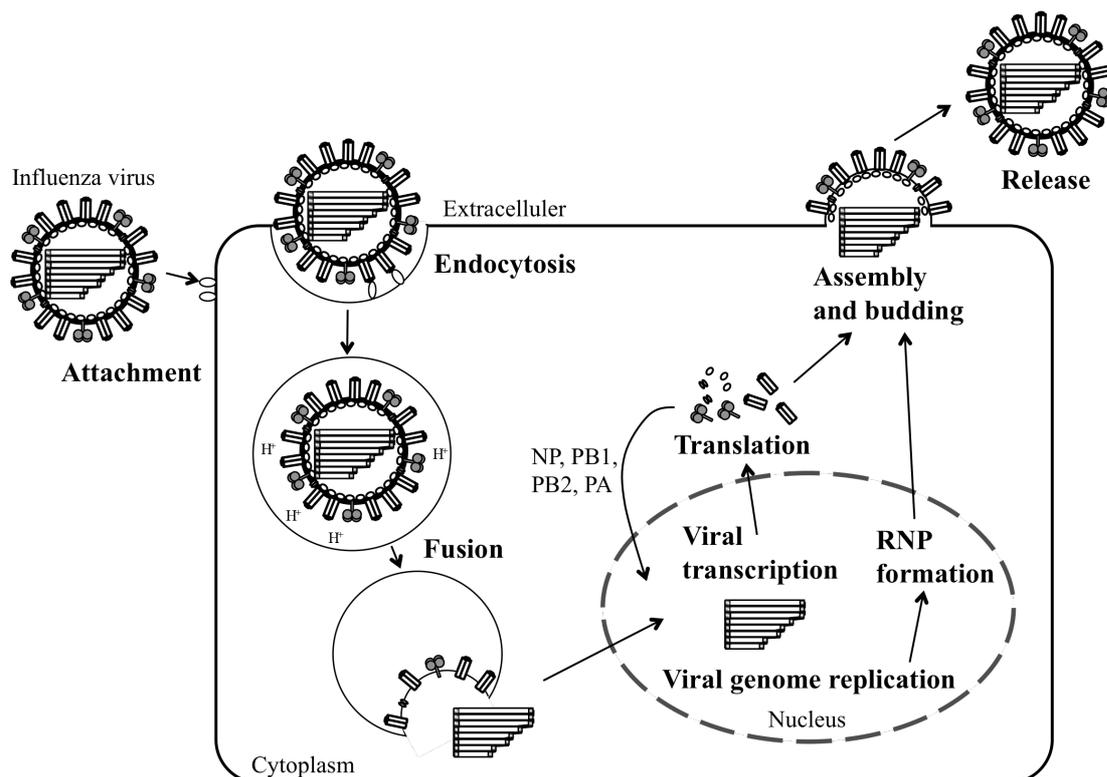
## 序論

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属する直径 150~200 nm のエンベロープを纏ったウイルスであり、ゲノムとして 8 分節のマイナス鎖 RNA を有する (Fig. 1). 第 1~第 6 RNA 分節には、3 種の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (PB1, PB2 及び PA), ヘマグルチニン (HA), 核タンパク質 (NP), ノイラミニダーゼ (NA) がコードされる. また、選択的スプライシングにより、第 7 分節からは膜タンパク質 (M1) とイオンチャンネル (M2) が、第 8 分節からは非構造タンパク質 1 (NS1) と NS2 の 2 種類のタンパク質が合成される. NP はポリメラーゼとともに vRNA に結合して RNA-NP (ribonucleoprotein: RNP) 複合体を形成している. NP の抗原性によって、インフルエンザウイルスは A 型, B 型ならびに C 型に分類される.<sup>1)</sup>



**Fig. 1. Structure of Influenza A Virus**

インフルエンザウイルスの感染は、HA が宿主細胞上のシアル酸に結合することによって開始される (Fig. 2). HA によって細胞表面に吸着したウイルスは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる. エンドソーム内の酸性 pH 条件下では、RNP 複合体は M2 イオンチャンネルを介したウイルス粒子内への  $H^+$  の流入によって M1 から遊離し、ウイルスゲノムは脱殻に備える.<sup>2)</sup> また、酸性下では HA の立体構造が変化してエンドソーム膜とウイルスエンベロープとを融合させる.<sup>3)</sup> これによって M1 から遊離したウイルスゲノムは細胞質内に放出される. A 型インフルエンザ治療薬であるアマンタジンは M2 に結合して  $H^+$  の流入を阻害し、ウイルスゲノムの細胞質内への放出を防ぐ.<sup>4)</sup> 放出されたゲノムは核内に運ばれ、転写とゲノム複製が行われる. 新生 RNA は核内で RNP 複合体を形成した後、HA 及び NA が埋め込まれ、M1 で裏打ちされた細胞膜直下へ移動し、



**Fig. 2. Schematic Diagram of the Influenza Viral Life Cycle**

そこでウイルスが再構築されて出芽する。その際、NA が細胞表面のシアル酸を除去することによって子孫ウイルスは細胞表面から遊離する。<sup>5)</sup>A 型及び B 型インフルエンザ治療薬である NA 阻害剤はシアル酸類似体であり、NA の活性中心に入り込み、その酵素活性を阻害する。これによりウイルスの放出を阻害し、感染の拡がりを抑える。<sup>6,7)</sup>

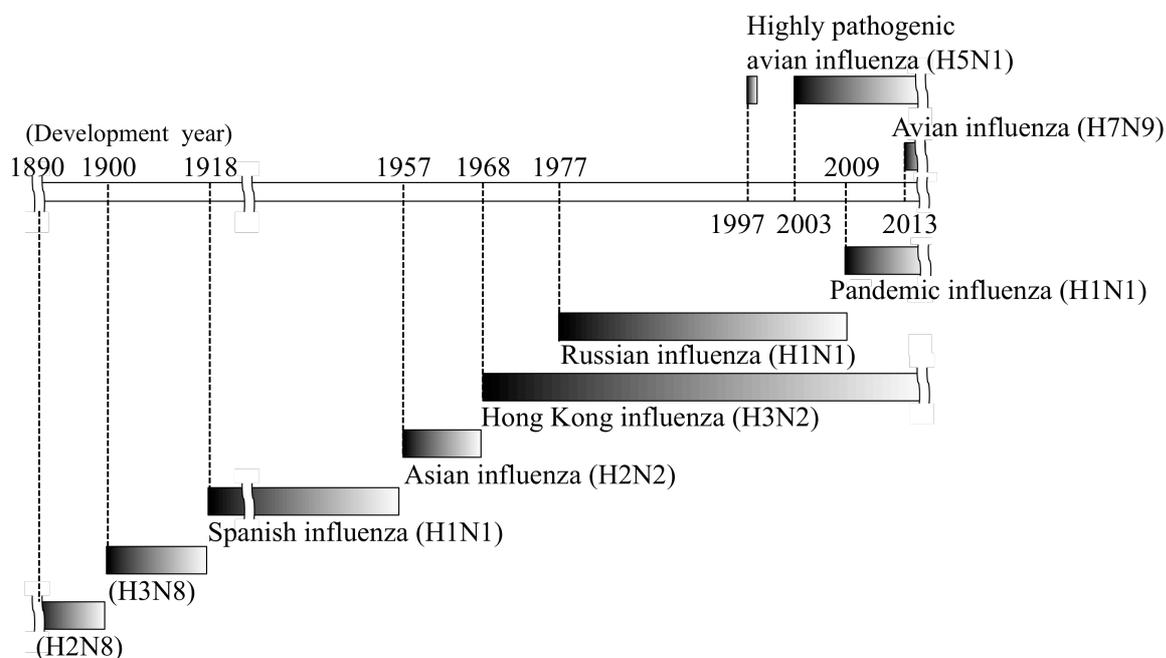
インフルエンザは、地球上に最も広く分布する人獣共通感染症である。<sup>8)</sup> 毎年のように流行を繰り返す A 型インフルエンザウイルスは、ヒトを始めブタ、ウマ、ミンクなどの家畜、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウなどの家禽、アザラシ、クジラなどの野生動物、カモやカモメを含む多くの種類の野鳥に分布している。<sup>9-12)</sup> A 型ウイルスは、第 4 分節及び第 6 ゲノム分節にコードされるウイルスエンベロープ上の HA 及び NA 糖タンパク質の抗原特異性によって、それぞれ 16 及び 9 の亜型に分けられる。<sup>13)</sup> 現在、ヒトの間では H1N1 及び H3N2 亜型ウイルスのみが流行しているが、鳥類の間ではすべての亜型のウイルスが循環しており、すべての HA 及び NA 亜型遺伝子の起源は鳥類のウイルスにあると考えられている。<sup>14)</sup> さらに、カモのインフルエンザウイルスに対する免疫応答は弱く、<sup>15)</sup> 異なる亜型のウイルスには繰り返し感染する。インフルエンザウイルスに感染した多くのカモは、営巣地であるアラスカやシベリアの湖沼水中に糞便とともにウイ

ルスを排泄する。新たに生まれる多数のヒナによってこれらのウイルスは増幅され、彼らの渡りによって世界各地に運搬される。また、カモが南方に渡った後にもウイルスは湖沼水中に存続し、冬期間凍結保存される。<sup>16)</sup> このように、渡りガモはインフルエンザウイルスの自然界における増幅、運搬の役割を担い、カモが営巣する北方の湖沼はインフルエンザウイルスの貯蔵庫となっている。

鳥インフルエンザウイルスの HA は、主に鳥の大腸及び気道上皮に存在するガラクトースと  $\alpha$ 2-3 結合したシアル酸 (SA  $\alpha$ 2-3Gal) を認識し、ヒト由来ウイルスは主としてガラクトースと  $\alpha$ 2-6 結合したシアル酸 (SA  $\alpha$ 2-6Gal) を認識する。<sup>17)</sup> ヒトの呼吸器の深部である細気管支や肺胞には SA  $\alpha$ 2-3Gal が存在するが、上部気道上皮には SA  $\alpha$ 2-6Gal が多く存在する。<sup>18)</sup> そのため、通常、鳥ウイルスがヒトに感染することはなく、万一感染が成立してもヒト-ヒト感染を引き起こすことは極めて稀である。一方、ブタは鳥ウイルスの受容体である SA  $\alpha$ 2-3Gal とヒトウイルスの受容体である SA  $\alpha$ 2-6Gal の両方を上部気道上皮に有する。そのため、両方のウイルスに同時に感染すると、その体内で各遺伝子分節が入れ替わる遺伝子再集合が生じる。<sup>19)</sup> 従来流行していた亜型と異なるウイルスがヒトの間に出現し、遺伝子再集合や突然変異によってヒト間における伝播力を獲得すると、新型ウイルスとしてパンデミックを引き起こす。1968 年に出現した A/HongKong/1968 (H3N2) は、中国南部のブタに共感染した H3 亜型のアヒルのウイルスとそれまでヒトの間で流行していた H2N2 ウイルスとが遺伝子再集合を起こして生まれたと考えられている。<sup>20)</sup>

20 世紀、人類は 4 度のパンデミック、1918 年スペインかぜ (H1N1 亜型)、1957 年アジアかぜ (H2N2 亜型)、1968 年香港かぜ (H3N2 亜型) 及び 1977 年ロシアかぜ (H1N1 亜型) を経験した (Fig. 3)。なかでも、1918-19 年のパンデミックでは全世界で 4,000 万人以上が死亡し、その死亡率は 2.5~10%程度と推定されている。<sup>21-23)</sup> 最後のパンデミックの発生から 40 年以上が経過した 2009 年、ブタ、ヒト及び鳥インフルエンザウイルスの遺伝子再集合体である新型 H1N1 インフルエンザウイルス [A (H1N1) pdm09] がヒトの間に出現し、21 世紀最初のパンデミックを引き起こした。<sup>24,25)</sup> 一方、1997 年香港において H5N1 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1-HPAI) ウイルスが家禽の間で流行し、ヒトへの感染も確認された。<sup>26)</sup> 2003 年以降、東南アジア・エジプトを中心に H5N1-HPAI 患者は 600 名を超え、死者は 378 名に達している。<sup>27)</sup> また、2003 年には、オランダで高病原性の H7N7 鳥ウイルスがヒトから分離され、89 名の感染と 1 名の死亡が報告されている。<sup>28)</sup> さらに、2013 年

には中国と台湾で H7N9 鳥ウイルスのヒトへの感染が確認され、これまでに 135 名が感染し、44 名が死亡している。<sup>29,30)</sup> これまでのところ、これらの鳥ウイルスによるヒト-ヒト感染はほとんど報告されていないが、一度これらのウイルスがヒトの間で伝播力を獲得すると未曾有のパンデミックを引き起こすこととなる。



**Fig. 3. Human Fashion History of Influenza A**

現在、H5N1-HPAI に対するワクチンはプレパンデミックワクチンとして備蓄されており、H7N9 鳥インフルエンザに対するワクチンの製造も検討されている。さらに、パンデミックの発生に備えて NA 阻害抗インフルエンザ薬であるオセルタミビルの備蓄も行われている。しかしながら、すでにニワトリのみならずヒトからもオセルタミビル耐性の H5N1-HPAI ウイルスが分離されている。<sup>31)</sup> 新型インフルエンザウイルスの出現機構が明らかになるにつれ、鳥類インフルエンザに対する監視の重要性はますます増大している。

本研究の第 1 章では、A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発と、これを応用した未知の亜型ウイルスにも対応可能な亜型判別法の確立について述べる。また、これらの方法を用いて実施した鳥類インフルエンザの分子疫学についても報告する。次いで、第 2 章では 2009 年に発生したパンデミックウイルスの北海道医療大学における流行状況と、薬剤耐性株の性状解析について述べる。

## 本論

### 第1章 A型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発と応用

#### 第1節 A型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法の開発と亜型判別法への応用

##### 1) 緒言

A型インフルエンザウイルスは、ヒト、ブタ、ウマ、クジラ、アザラシなどの哺乳類のみならず、野生のカモを始めとする鳥類に広く分布する。<sup>9-12)</sup> ウイルスエンベロープには2種類のスパイク糖タンパク質 HA 及び NA が埋め込まれ、各々H1~H16 及び N1~N9 の抗原亜型が存在する。<sup>13)</sup> 現在、ヒトの間ではH1N1 及び H3N2 ウイルスのみが、また、ブタの間では H1N1, H1N2, H3N2 ウイルス、ウマの間では H3N8 ウイルスのみが流行している。一方、カモ及びカモメなどの水禽の間ではすべての亜型のウイルスが循環している。<sup>14)</sup>

インフルエンザ迅速診断キットは、1999年にわが国に導入されて以来、急速に普及し、臨床では病原診断に欠かせない検査となった。しかし、A型ウイルスの亜型を判定するには至らず、新型ウイルス出現に備えた疫学調査には不十分であった。通常、A型インフルエンザウイルスの HA 及び NA の亜型同定は、各々のスパイク糖タンパク質に対応した16種及び9種の抗血清を用いた赤血球凝集阻止試験及びNA阻止試験によって行われる。<sup>32)</sup> しかし、これらの抗血清パネルを各実験室で用意することは極めて困難であり、ヒト以外の動物を対象とした疫学調査は、世界的にも限られた研究施設でのみ実施されていた。一方、近年では両スパイク糖タンパク質遺伝子のみならず、内部タンパク質遺伝子についても解析が進められ、インフルエンザウイルスの生態解明に寄与している。

A型インフルエンザウイルスのすべての RNA 分節は、その3'末端及び5'末端の12塩基(Uni12)及び13塩基(Uni13)の配列が共通である。また、これらの配列はすべてのウイルス株間で保存されている(Fig. 1)。<sup>33,34)</sup> これまで、この共通配列を用いたA型インフルエンザウイルス全ゲノムの増幅が試みられてきた。Adeyefaら<sup>35)</sup>は、Uni12及びUni13に相補的な配列をプライマーとして用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)によって、ウマのH7N7ウイルスの全ゲノム

RNA の増幅に成功した。しかしながら、12~13 塩基長と短いプライマーゆえに適切なアニーリング温度の設定が困難であったことから、その後の実用化には至っていない。一方、Alvarez ら<sup>36)</sup>は1組のプライマー対を用いたワンステップ RT-PCR によって全9種類の NA 亜型遺伝子を検出できることを報告したが、この方法は NA 遺伝子の約 1/5 に相当する 300 塩基を増幅するのみであった。また、Hoffmann ら<sup>37)</sup>は分節特異的な配列の 5'端側に Uni12 及び Uni13 に相補的な配列を付加したプライマーを用いて各分節を増幅する方法を考案した。この方法は、HA の 16 亜型及び NA の 9 亜型中 N1, N2, N4, N5 及び N8 についてはそれぞれ 1 対のプライマーで対応可能であったが、N3, N6, N7 及び N9 についてはそれぞれ亜型特異的なプライマーが必要であった。したがって、未知の亜型の A 型インフルエンザウイルスの HA 及び NA 遺伝子には適合しないことも予想される。このように、通常、A 型インフルエンザウイルス全ゲノムの増幅には、ウイルス株ごとに 8 本の分節特異的なプライマー対が必要である。さらに、H1~H16, N1~N9 の亜型に対応するためには極めて多数のプライマーが必要となる。<sup>38-40)</sup>

一方、高濃度のまま継代を繰り返されたインフルエンザウイルスでは、一部の RNA 分節の内部領域を欠損した欠陥干渉 (defective interfering: DI) 粒子が容易に産生されることが知られている。<sup>41-43)</sup> 自然界においてこの DI-RNA 分節は子孫ウイルスに受け継がれる。<sup>41)</sup>したがって、DI-RNA の検出及びその解析はインフルエンザウイルスの生態解明に有用と考えられる。

本章第 1 節では、単一のプライマー対による A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法を開発し、未知の亜型を含むウイルスの亜型判別法を確立した。また、本法によって DI-RNA 分節を簡便に検出することに成功した。さらに、第 2 節ではこれらの全ゲノム増幅法及び亜型判別法を用いて、北海道に飛来した野鳥の糞便から分離したインフルエンザウイルスの亜型判別を行った。2008 年に分離された H5N1 亜型ウイルスについては、全ゲノムの進化系統解析を行った。

## 2) 材料及び方法

### (1) ウイルス及び RNA の調製

A 型インフルエンザウイルス A/Aichi/2/1968 (H3N2), A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6), A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) 及び遺伝子再集合体である A/NWS/1933×A/tern/Australia/G70c/1975 (H1N9) を用いた (Table 1). N2, N3, N6, N7, N9 亜型遺伝子を増幅する場合, Hoffmann らの方法<sup>37)</sup>では各々異なるプライマー対を要する. これらのウイルスを 10 日齢発育鶏卵尿膜腔内に接種し, 35°C で 2 日間培養した. 4°C に放置して血球を沈降させた後, 尿液を採取し, RNA 抽出キット QuickGene RNA tissue kit S II (FUJIFILM) を用いて RNA の抽出・精製を行った. すなわち, 尿液を 150,000 ×g で 1 時間遠心し, 沈渣を lysis buffer 500 µl に溶解した. これに solubilization buffer 227 µl を加え, 15 秒間攪拌した. 99.5%エタノール 182 µl を加え, 1 分間攪拌し, 上清を得た. 全量を自動核酸抽出システム QuickGene (FUJIFILM) 上のカートリッジに加圧添加した. wash buffer 750 µl で 1 回洗浄後, elution buffer 100 µl を添加した. 4 分間放置した後, 加圧して RNA を回収した.

**Table 1. Influenza Virus Strains Used in this Chapter**

Virus	Subtype
A/Aichi/2/1968	H3N2
A/swan/Shimane/499/1983	H5N3
A/duck/Czechoslovakia/1956	H4N6
A/chicken/Germany/N/1949	H10N7
A/NWS/1933 (H1N1) ×A/tern/Australia/G70c/1975 (H11N9)	H1N9

### (2) プライマーの設計

制限酵素 *Kpn* I, *Nco* I, *Xba* I の認識配列を含む 21 塩基の RV 及び *Pst* I, *Sse*8387 I, *Xba* I の認識配列を含む 21 塩基の FW を設計した. A 型インフルエンザウイルスゲノム RNA 分節の 5'末端の共通配列 (Uni13) 及び 3'末端の共通配列 (Uni12) の相補配列の上流に RV 及び FW を付加した RVUni13 及び FWUni12 をプライマーとして用いた (Table 2). プライマーの合成はファスマックに委託した.

**Table 2. Primers Used in this Chapter**

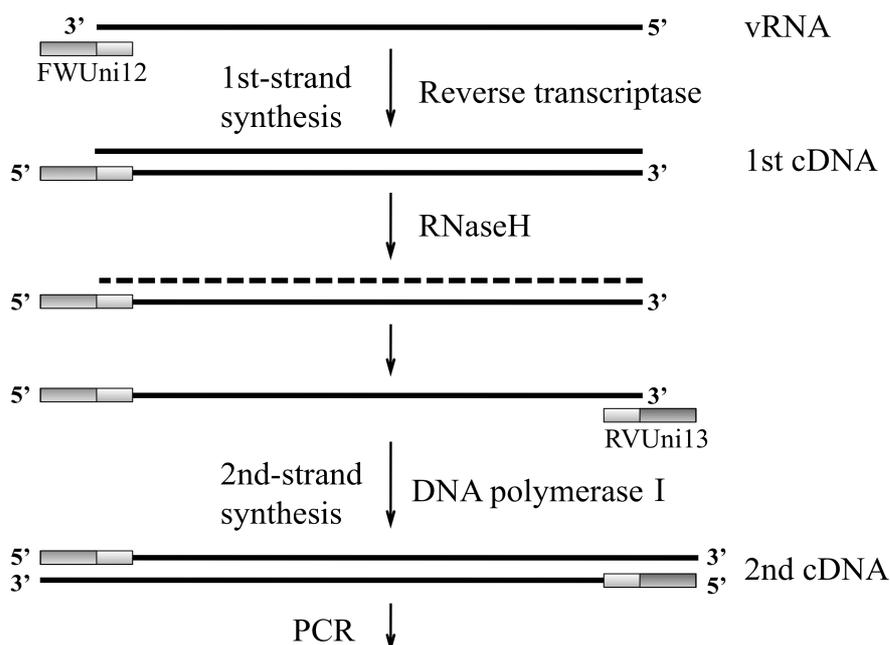
Primer	Nucleotide sequence
RVUni13	5' - CGTGGTACCATGGTCTAGAGTAGTAGAAACAAGG - 3' <div style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 40px;">┌──────────┐</span> <span style="margin-right: 40px;">┌──────────┐</span> <span style="margin-right: 40px;">┌──────────┐</span> <span style="margin-right: 40px;">*1</span> </div> <div style="text-align: center; margin-top: -10px;"> <span style="margin-right: 40px;"><i>Kpn</i> I</span> <span style="margin-right: 40px;"><i>Nco</i> I</span> <span style="margin-right: 40px;"><i>Xba</i> I</span> </div>
FWUni12	5' - CTGATCTAGACCTGCAGGCTCAGCAAAGCAGG - 3' <div style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 40px;">┌──────────┐</span> <span style="margin-right: 40px;">┌──────────┐</span> <span style="margin-right: 40px;">*2</span> </div> <div style="text-align: center; margin-top: -10px;"> <span style="margin-right: 40px;"><i>Xba</i> I</span> <span style="margin-right: 40px;"><i>Pst</i> I</span> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <span style="margin-right: 40px;"><i>Sse</i> 8387 I</span> </div>

\*1 and \*2 are complementary sequences to the Uni13 and Uni12, respectively.

### (3) 逆転写反応及びウイルスゲノムの増幅

逆転写反応には universal RiboClone<sup>®</sup> cDNA synthesis system (Promega) を用いた。抽出した RNA 8 µl に 10 mM FWUni12 4 µl, nuclease-free water (Ambion<sup>®</sup>) 3 µl を加え全量を 15 µl とした。次いで, Heat block fastgene<sup>™</sup> (NIPPON Genetics) 中で 70°C, 10 分間加熱した。これを氷上に 5 分間静置した後, 数秒間遠心し, first-strand 5×buffer (Promega) 4 µl, RNasin<sup>®</sup> ribonuclease inhibitor (Promega) 1 µl を加え 42°C で 5 分間保温した。その後, 40 mM sodium pyrophosphate 2.5 µl (Promega), AMV reverse transcriptase (Promega) 30 単位 (1.5 µl) を添加し, 42°C で 1 時間反応させ, 1 st cDNA を得た。これに second strand 2.5×buffer (Promega) 40 µl, 1 mg/ml acetyl BSA (Promega) 5 µl, 10 mM RVUni13 2 µl, RNaseH (Promega) 0.8 単位 (0.5 µl) を加え, nuclease-free water で全量を 100 µl として 37°C に 1 時間放置した。90°C で 1 分間加熱することで RNaseH を失活させた後, 急冷した。これに DNA polymerase I (Promega) 23 単位 (2.55 µl) を加え, 14°C で 3 時間反応させ, 二本鎖 cDNA を得た。その後, 70°C で 10 分間加熱して酵素を失活させた。

PCR 溶液は 10×AccuPrime<sup>™</sup> reaction mix (Invitrogen) 5 µl, 10 µM の FWUni12 及び RVUni13 を 1.5 µl ずつ, AccuPrime<sup>™</sup>Pfx DNA polymerase (Invitrogen) 1.25 単位 (0.5 µl), 二本鎖 cDNA 30 µl を加え, 滅菌精製水で全量を 50 µl とした。遺伝子増幅装置として iCycler (Bio-Rad) を用い, 94°C 1 分間加熱後, 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 3 分の反応を 35 サイクル行った後, 72°C 5 分の反応を行った (Fig. 4)。アニーリング温度は, 予備実験で 45°C~70°C に設定した際の成績に基づき決定した。



**Fig. 4. Method for Full-length Amplification of Influenza A Virus Genome**

#### (4) アガロースゲル電気泳動

泳動用緩衝液には1×TAE緩衝液 [40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM 酢酸, 1 mM EDTA, 0.1 μg/ml 臭化エチジウム (和光純薬)] を用いた. 泳動用緩衝液に agarose S (Nippon Gene) を 1.5% (w/v) になるように溶解してアガロースゲルを作製した. DNA 溶液 5 μl に 6×loading buffer (Takara) [30 mM EDTA, 36%グリセリン, 0.05%ブROMフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール] を 1 μl 加え, 泳動用試料を調製した. 泳動用緩衝液に浸したアガロースゲルの試料溝に調製試料を添加し, Mupid-2x 泳動装置 (ADVANCE) を用いて 100 V 定電圧で泳動した. トランスイルミネーター上にゲルを置き, LAS-1000 UV mini<sup>®</sup> (FUJIFILM) を用いて蛍光を検出した.

#### (5) DNA 断片の精製

アガロースゲル電気泳動で分画した DNA 断片を Wizard<sup>®</sup> SV and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製した. アガロースゲルをスーパーLED ビューアー (BioSpeed) 上に置き, 目的とするバンドをメスで切り出した. 切り出したゲルを秤量し, 10 mg に対して 10 μl の割合で membrane binding solution を加え, 55°C 中で 10 分間またはゲルが完全に

融解するまで攪拌した。SV minicolumn にゲル融解液を添加後、室温で1分間静置した。SV minicolumn assembly を 15,000×g で1分間遠心し、DNA をカラムに吸着させた。Membrane wash solution 700 µl で2回洗浄した後、nuclease-free water を 50 µl 加え、1分間室温で静置した。その後、15,000×g、1分間遠心して精製 DNA 溶液を溶出した。

## (6) DNA 連結反応及び大腸菌の形質転換

制限酵素 *EcoRV*(Takara) を用いてプラスミドベクター pBluescript II KS(+) (Agilent Technologies) を切断した。酵素反应用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl] にプラスミド DNA 1 µg, 制限酵素 3 単位を加えて 37°C で1時間反応後、アガロースゲル電気泳動で DNA の切断を確認した。DNA 1 µg に対して shrimp-alkaline phosphatase (Takara) 1 単位を加え、添付の緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>] 中で、37°C, 30 分間反応させて脱リン酸化処理を行った。その後、65°C で15分間加熱し、酵素を失活させた。

PCR 産物 1-5 pmol に対して T4 polynucleotide kinase (Takara) 20 単位, 10 mM ATP 5 µl を加え、添付の緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ジチオトレイトール] 中で 37°C, 1 時間反応させ、産物の両端をリン酸化した。

DNA 連結反応には DNA ligation kit (Takara) を用いた。TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA] で 50 ng/µl に調製したベクター1 µl, リン酸化した PCR 産物 4 µl に Solution I 5 µl を加え、4°C で16時間反応させた。

コンピテント細胞 JM109 懸濁液 (TOYOBO) 100 µl にプラスミド溶液 5 µl を加え水中に1時間、42°C で30秒間、さらに水中で10分間放置後、LB 培地 [1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) トリプトン (Difco), 0.5% (w/v) yeast extract (和光純薬)] 900 µl を加え 37°C, 1 時間振盪培養した。この培養液 100 µl を 1 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG), 100 µg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-gal) 及び 50 µg/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地 [1.5% (w/v) bacto agar (Difco) 添加 LB 培地] に塗布し、37°C で16時間培養して形質転換株を選択した。

## (7) プラスミドの精製

アンピシリン, IPTG 及び X-gal 添加 LB 寒天培地上の白色コロニーを釣菌し、アンピシリン添加 LB 培地 2 ml 中で 37°C 16 時間振盪培養した。2,500×g で 4°C, 10 分間遠心し、

沈渣を resuspension buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A] 100 µl に懸濁した。Lysis buffer [200mM NaOH, 1% (w/v) SDS] を 100 µl 添加し、転倒混和後、室温で 5 分間静置した。3 M 酢酸カルシウム (pH5.5) を 100 µl 添加して転倒混和後、20,000 ×g で 4°C, 10 分間遠心した。上清を回収して TE 緩衝液飽和フェノールを 300 µl 加えて攪拌後、20,000 ×g で 4°C, 10 分間遠心した。新しい 1.5 ml マイクロチューブに水層を移し、イソプロパノール及び 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) をそれぞれ 210 µl 及び 30 µl 加えて転倒混和後、-80°C に 30 分間放置した。20,000 ×g で 4°C, 30 分間遠心後、上清を除去した。70% エタノールを 50 µl 加え、20,000 ×g, 4°C, 5 分間遠心して沈殿を洗浄した。真空乾燥後、TE 緩衝液を 10 µl 加えて室温で 1 時間静置し、完全に溶解させた。これを精製プラスミド溶液とした。

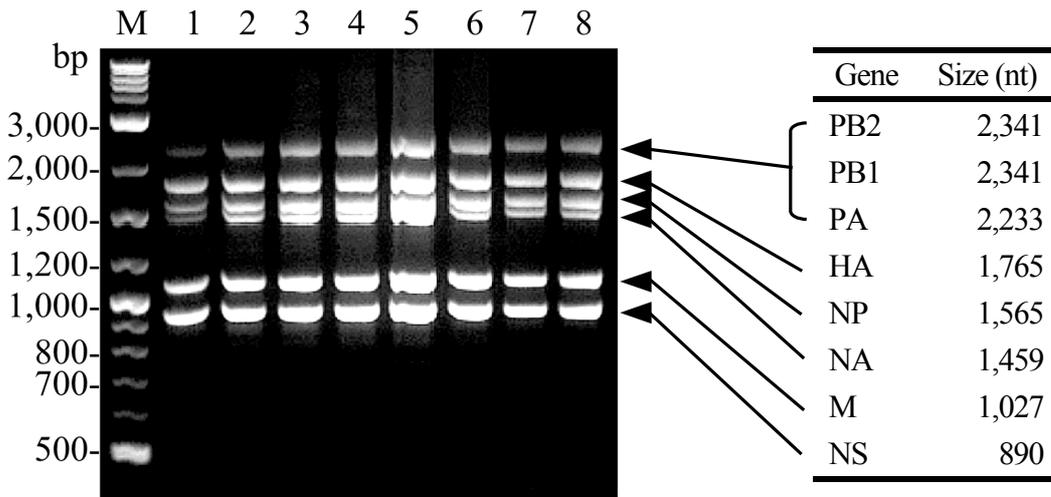
#### (8) 塩基配列の決定

BigDye<sup>®</sup> Terminators v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) 及び ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。鋳型 DNA (PCR 産物 : 10~40 ng, 精製プラスミド : 150~300 ng), RVUni13 または FWUni12 (最終濃度 3.2 µM), 5×sequencing buffer 2 µl, premix solution 4 µl に滅菌精製水を加え全量 20 µl に調製した。精製プラスミドを鋳型とした場合には、T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') または T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGAA-3') をプライマーとして用いた。iCycler を用いて 96°C で 5 分間熱変性させた後、96°C 30 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分の反応を 25 サイクル行った。反応液に 125 mM EDTA 及び 99.5% エタノールをそれぞれ 5 µl 及び 60 µl 加えて転倒混和後、室温で 15 分間静置した。15,000 ×g, 30 分間遠心した後、上清を除去した。沈殿を 70% エタノールで洗浄し、Hi-Di<sup>™</sup> formamide (Applied Biosystems) を 20 µl 加えて 95°C で 2 分間加熱した。氷中で冷却後、ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer を用いてキャピラリー電気泳動に供した。DNA の塩基配列は ABI PRISM 310 の付属ソフトを用いて決定した。

### 3) 結果

#### (1) A/Aichi/2/1968 (H3N2) 全ゲノムの増幅

A/Aichi/2/1968 (H3N2) 感染発育鶏卵尿液から抽出した RNA を鋳型とし, FWUni12 をプライマーとして用いた逆転写反応を行い, さらに RVUni13 及び DNA polymerase I を用いて二本鎖 cDNA を合成した. この二本鎖 cDNA を鋳型とし, FWUni12 及び RVUni13 をプライマーとして PCR を行った. 増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供した結果, 約 2.3kb, 1.8kb, 1.6kb, 1.5kb, 1.1kb 及び 0.9kb の 6 本のバンドが認められた. PCR のアニーリング温度を 45°C~70°Cの間で検討したところ, 60.8°Cにおいて最も効率良い増幅が認められた (Fig. 5). 6 本のバンドは A 型インフルエンザウイルスの PB1 (2,341 塩基), PB2 (2,341 塩基), PA (2,233 塩基), HA (1,766 塩基), NP (1,565 塩基), NA (1,459 塩基), M (1,027 塩基) 及び NS (890 塩基) 遺伝子のサイズとよく一致していた. 2.3kb 断片を除く増幅産物を切り出して精製し, FWUni12 及び RVUni13 を用いてダイレクトシーケンシングを行った. 1.8kb 断片では, 5'末端から 312 塩基ならびに 3'末端から 463 塩基が決定された. これらを Blast 解析に供したところ, 各々 A/Aichi/2/1968 (H3N2) の HA 遺伝子の塩基配列と一致していた. 同様にして, 1.6kb 断片は NP 遺伝子, 1.5kb 断片は NA 遺伝子, 1.1kb 断片は M 遺伝子, 0.9kb 断片は NS 遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した (Table 3). また, 2.3kb 断片をプラスミドにクローニング後, 62 クローンについて塩基配列を解析した. その結果, 2 クローンから PB1 遺伝子, 6 クローンから PB2 遺伝子及び 54 クローンから PA 遺伝子の配列が検出された (Table 4). 以上の成績から, A/Aichi/2/1968 (H3N2) の全ゲノム分節の増幅が確認された.



**Fig. 5. Full Length Amplification of All Eight Segments of A/Aichi/2/1968 (H3N2) by RT-PCR**  
 The annealing temperature was varied from 45°C to 70°C. Lane M, 2-Log DNA ladder, lanes 1 to 8, annealing at 70°C, 68.3°C, 65.3°C, 60.8°C, 54.5°C, 49.9°C, 46.5°C and 45°C.

**Table 3. Result of Blast Analysis on the Amplicons Derived from A/Aichi/2/1968 (H3N2)**

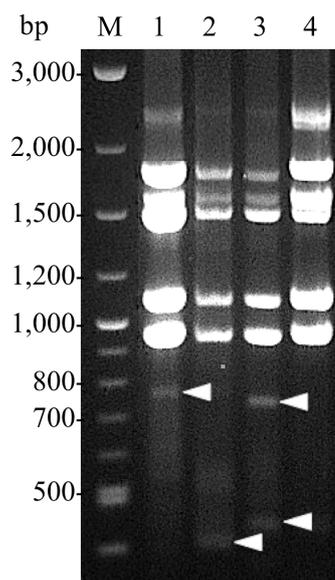
Amplicons (kb)	Sequencing primer	Number of nucleotide	The highest homology with
2.3	T7	301	PB2 gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	T3	374	PB2 gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
2.3	T7	322	PB1 gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	T3	354	PB1 gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
2.3	T7	337	PA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	T3	276	PA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
1.8	FWUni12	312	HA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	RVUni13	463	HA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
1.6	FWUni12	412	NP gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	RVUni13	341	NP gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
1.5	FWUni12	227	NA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	RVUni13	415	NA gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
1.1	FWUni12	473	M gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	RVUni13	422	M gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
0.9	FWUni12	219	NS gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	RVUni13	533	NS gene of A/Aichi/2/1968 (H3N2)

**Table 4. Frequency of the Polymerase Genes of A/Aichi/2/1968 (H3N2) Cloned into the Plasmid**

	Number of clones (%)		
	PB1	PB2	PA
Exp 1	1 (3.3)	2 (6.7)	27 (90.0)
Exp 2	1 (3.1)	4 (12.5)	27 (84.4)
Total	2 (3.2)	6 (9.7)	54 (87.1)

## (2) 異なる NA 亜型ウイルスの全ゲノム増幅

(1) で述べたように、一組のプライマー対を用いてインフルエンザウイルス A/Aichi/2/1968 (H3N2) の全ゲノムを増幅することに成功した。そこで、本法を用いて異なる NA 亜型 (N3, N6, N7, N9) のウイルスについて全ゲノム増幅を試みた。PCR のアニーリング温度は 60°C で行った。その結果、A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) 及び A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) のポリメラーゼ遺伝子に相当する 2.3kb の増幅はわずかであったものの、調べた全ての NA 亜型インフルエンザウイルスにおいて全ゲノムを増幅することに成功した (Fig. 6)。PCR の伸長反応の時間を延長しても 2.3kb の増幅に変化はみられなかった。しかしながら、これらのバンドを鋳型として再び PCR を行ったところ、2.3kb の位置に明瞭なバンドがみられた。また、A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) 及び A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) の増幅産物には、NS 遺伝子に相当する断片よりも短い断片が確認された。各ウイルスの増幅産物の NA 遺伝子に相当する 1.5kb 断片を切り出して精製し、FWUni12 及び RVUni13 を用いてダイレクトシーケンシングを行った。その結果、いずれの増幅産物もそれぞれの NA 亜型遺伝子と塩基配列がよく一致していた。



**Fig. 6. Amplification of the Whole Genome of Influenza A Viruses Representing Four Different NA Subtypes**

Lane M, 2-Log DNA ladder, lanes 1 to 4, A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6), A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) and a reassortant virus A/NWS/1933 × A/tern/Australia/G70c/1975 (H1N9). Arrowheads show the extra bands, which are smaller than the NS gene.

### (3) 欠陥干渉 RNA 分節の検出

A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) の増幅産物中にみられた約 0.4kb 断片の由来を確認するため、FWUni12 及び RVUni13 を用いたダイレクトシーケンシングを行った。その結果、増幅産物は PB1 遺伝子の 1-137 及び 2,127-2,341 番塩基と一致した。したがって、0.4kb 断片は PB1 遺伝子由来であり、その中央部分が欠損した DI 遺伝子であると推定された。そこで、A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) 増幅産物中のポリメラーゼ遺伝子に相当する 2.3kb 断片をプラスミドにクローニングして塩基配列を決定し、含まれる遺伝子を確認した。46 クローンを調べたところ、22 クローン (47.8%) で PB2 遺伝子、24 クローン (52.2%) で PA 遺伝子の塩基配列が認められ、PB1 遺伝子は認められなかった (Table 5)。一方、A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3) 及び A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) の約 0.8kb 及び 0.4kb 断片中には DI 遺伝子と推定される塩基配列は見られなかった。

**Table 5. Frequency of the Polymerase Genes of A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) Cloned into the Plasmid**

	Number of clones (%)		
	PB1	PB2	PA
Exp 1	0 (0.0)	11 (57.9)	8 (42.1)
Exp 2	0 (0.0)	11 (40.7)	16 (59.3)
Total	0 (0.0)	22 (47.8)	24 (52.2)

#### 4) 考察

今回、一組のプライマー対を用いて5株のA型インフルエンザウイルス A/Aichi/2/1968 (H3N2), A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6), A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) 及び A/NWS/1933×A/tern/Australia/G70c/1975 (H1N9) の全ゲノムを増幅することに成功した。さらに、得られた DNA 断片の塩基配列を同じプライマーを用いたダイレクトシーケンシングにより決定し、亜型の判別にも成功した。Hoffmann ら<sup>37)</sup> は7組の共通プライマーを用いて各分節を増幅することを報告している。しかし、9種のNA亜型のうちN1, N2, N4, N5及びN8亜型遺伝子は1組のプライマー対で増幅出来るものの、その他のNA亜型遺伝子についてはそれぞれに特異的なプライマー対が必要であった。すなわち、Hoffmann らの方法では既知のA型ウイルスの亜型判別に最低6組のプライマーが必要なことになる。2009年にグアテマラのコウモリから未知の亜型のA型インフルエンザウイルスが分離された。<sup>44)</sup> 本ウイルスのUni12とUni13相当配列は、既知のウイルスのそれらとUni12の第5塩基を除いて一致していた。しかしながら、分節特異的な配列ではPB2, HA, M, NS遺伝子でHoffmann らのそれとは異なっていた。したがって、Hoffmann らの方法はこれらの4遺伝子への適応は不可能と考えられる。一方、本研究で開発した全ゲノム増幅法ではUni12とUni13に相補的な配列のみを用いることから、コウモリから分離された未知の亜型ウイルスにも応用が可能と考えられる。

A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3), A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) 及び A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) では、2.3kb断片は3種のポリメラーゼ遺伝子に由来する増幅産物であるにもかかわらず少量しか得られなかった。ポリメラーゼ遺伝子が他の遺伝子分節に比べて大きいために増幅効率が低かったことによるものと考えられる。3種のポリメラーゼ遺伝子は電気泳動では分画することが出来ない。したがって、これらの遺伝子を得る場合に限っては各分節に特異的な配列のプライマーを用いることがより簡便と考えられる。本研究では、増幅産物をプラスミドにクローニング後、塩基配列を決定することによって遺伝子の同定を行った。A/Aichi/2/1968 (H3N2) では、PA遺伝子を含むクローンの割合がPB1及びPB2と比較して高かった。A型インフルエンザウイルスのRNA分節は粒子中にそれぞれ等モル数含まれていると考えられている。<sup>45)</sup> ほとんどのPB1遺伝子を欠く A/duck/ Czechoslovakia/1956 (H4N6) のクローニング成績はこの仮説とよく一致

した。一方、A/Aichi/2/1968 (H3N2) で PA 遺伝子が高い頻度でクローニングされた原因は不明である。Uni12 及び Uni13 に相補的な配列を含むプライマーを増幅反応に用いたため、各 RNA 分節両端の実際の塩基配列は不明であるが、グアテマラのコウモリ由来ウイルスと同様に本ウイルス株の Uni12 あるいは Uni13 に変異がある可能性は否定できない。

インフルエンザウイルスでは、高濃度で継代を繰り返すと DI 粒子が容易に産生される。<sup>41-43)</sup> A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) の増幅産物中の 0.4kb 断片は PB1 遺伝子の中央部分を欠損した遺伝子であった。A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) の 2.3kb 増幅断片をクローニングしたところ、PB1 遺伝子は検出されなかった。したがって、本ウイルスのストックには、PB1 遺伝子の内部を欠損した DI 粒子が多く含まれていたことが示唆された。A/swan/Shimane/499/1983 (H5N3) 及び A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7) の増幅産物中に同様に認められた短い断片からは、DI-RNA と考えられる塩基配列は得られなかった。

本研究では、わずか一組のプライマー対を用いた A 型インフルエンザウイルスの全ゲノム増幅法を開発した。Zhou ら<sup>46)</sup> は、Hoffmann らのプライマーの 5' 端にプロモーター配列を連結して全遺伝子を発現する方法を開発した。本研究の全ゲノム増幅法もプロモーター配列を結合することによって発現系を構築することが可能である。また、プライマーに含まれる制限酵素認識部位を利用して発現ベクターへ再クローニングすることも容易である。このような発現系は、ワクチン製造を始め、A 型インフルエンザウイルスがコードする 10 種のタンパク質が担う様々な機能を解析する際に極めて有用と考えられる。また、DI-RNA 分節は自然界においても子孫ウイルスに受け継がれることが知られている。<sup>41)</sup> 本法によって DI-RNA 分節の検出が容易に出来ることから、自然界におけるインフルエンザウイルスの生態解明への応用も期待される。

## 第2節 全ゲノム増幅法及び新規亜型判別法を用いた鳥インフルエンザウイルスの分子疫学

### 1) 緒言

インフルエンザウイルスは、HA を介してシアル酸を末端に有する宿主細胞の受容体に吸着し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。HA はエンドソーム内の低 pH 環境下で立体構造を変化させ、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜の融合を引き起こし、ゲノム RNA が細胞質内に放出される。<sup>3)</sup> 膜融合を起こすためには、HA は HA1 と HA2 に開裂していることが必要である。高病原性の H5 及び H7 亜型ウイルスの HA では、開裂部位にリシンやアルギニンといった塩基性アミノ酸が連続して存在する。<sup>4)</sup> その場合、HA は全身の細胞に普遍的に存在するフリリンや前駆タンパク質転換酵素 6 などのタンパク質分解酵素によって開裂される。<sup>48)</sup> そのため、ウイルスは全身の臓器で増殖して強い病原性を発揮する。一方、低病原性ウイルスの HA は塩基性アミノ酸が連続せず、呼吸器や腸管にのみ存在するタンパク質分解酵素で開裂する。そのため、増殖部位はこれらの臓器に限られて低い病原性にとどまる。<sup>48)</sup> これまでに見つかっているすべての HPAI ウイルスは H5 及び H7 亜型である。<sup>49)</sup> また、HA タンパク質はウイルスの宿主特異性を決定する主要因であり、その特異性は受容体結合部位のアミノ酸の種類によって決定される。H1 亜型の場合、190 番と 225 番アミノ酸が受容体結合特異性に強く影響する。190 番アミノ酸がグルタミン酸及び 225 番アミノ酸がグリシンの場合、HA は鳥型受容体である SA $\alpha$ 2-3Gal を認識する。一方、これらが両方ともアスパラギン酸に変異すると、ヒト型受容体の SA $\alpha$ 2-6Gal を認識するようになる。<sup>50)</sup> H5N1 鳥ウイルスにおいては、182 及び 192 番アミノ酸が各々アスパラギンからリシン及びグルタミンからアルギニンに変異すると SA $\alpha$ 2-6Gal に対する親和性が増大する可能性が示されている。<sup>51)</sup>

NA は HA と同様にウイルスエンベロープに埋め込まれているが、HA とは異なり N 末側に膜貫通部位を有する II 型糖タンパク質である。シアリダーゼ活性を担う頭頂部と膜貫通部分を含む軸部分に分けられ、N1 亜型では 469 アミノ酸残基からなる。新たに産生されたウイルス粒子の糖タンパク質は、宿主細胞の酵素によってシアル酸の修飾を受ける。NA はこのシアル酸を除去してウイルス粒子の凝集を防ぎ、また、出芽の際に宿主細胞上の受容体を破壊することによってウイルス粒子の放出を助ける。<sup>5)</sup> 近年、軸領域の 5~20 アミノ酸を欠損した NA を有する鳥ウイルスがしばしば分離されている。<sup>52)</sup> また、

NA の軸領域を欠損する H5N1-HPAI ウイルスは、マウスに対する病原性が高くなることが報告されている。<sup>53)</sup> さらに、動物実験において HA の受容体結合活性と NA の受容体破壊活性のバランスが、ウイルスの増殖能・病原性に深く関与することが報告されている。<sup>54-56)</sup> また、NA の 275 番アミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異したオセルタミビル耐性 H5N1-HPAI ウイルスも検出されている。<sup>31)</sup>

インフルエンザウイルスのヒトでの増殖能や病原性を決定する因子として、HA や NA の他に PB2 及び NS1 のアミノ酸変異が知られている。ウイルスゲノムの転写・複製を司る RNA ポリメラーゼ構成要素の一つである PB2 は、インフルエンザウイルスの宿主域を規定する上で重要な役割を果たしている。大部分の鳥インフルエンザウイルスでは、PB2 の 627 番アミノ酸はグルタミン酸である。このアミノ酸がリシンに変異すると、鳥類の腸管に相当する 40°C よりも低い温度、すなわち哺乳類の上部気道の温度に相当する 33°C でも RNA ポリメラーゼが機能し、ウイルスは効率良く増殖するようになる。<sup>57)</sup> また、グルタミン酸の場合、哺乳類細胞では NP との相互作用に不備が生じて機能障害が起こる可能性も報告されている。<sup>58)</sup> PB2 は、マウスに対する病原性にも関与しており、H5N1-HPAI ウイルスではまた、701 番アミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンに変異することによってマウスに対する病原性が増大する。<sup>59)</sup>

NS1 は宿主細胞のインターフェロン産生を特異的に抑制する。<sup>60)</sup> また、宿主 mRNA の核外輸送を阻害することによって宿主遺伝子全般の発現を抑える。<sup>61)</sup> NS1 の 42 番、92 番及び 149 番のアミノ酸変異は、インターフェロンに対する抵抗性の増大や TNF $\alpha$  との拮抗によりウイルスの病原性に影響を及ぼすことが報告されている。<sup>62-64)</sup> さらに、1997 年に香港でヒトから分離された H5N1 ウイルスの NS1 にみられた 103 番と 106 番アミノ酸の変異は、マウスに対する病原性を強くすることが分かっている。<sup>63)</sup>

H5N1-HPAI は、世界各地のニワトリで流行を引き起こして大きな経済被害をもたらしてきた。ニワトリのウイルスがヒトに感染することは無いと考えられてきたが、1997 年に香港のニワトリで流行が認められた際にはヒトへの感染が初めて報告され、6 名の死者が確認された。<sup>26)</sup> H5N1-HPAI は、2003 年以降日本や中国、タイ、ベトナム、インドネシアなどの東南アジア諸国の家禽で発生、流行を繰り返している。2005 年からはモンゴル、ロシア、中近東、アフリカ、ヨーロッパ諸国にまで到達し、流行が確認されている。この流行拡大の一因として渡り鳥が関与していることが分かっている。<sup>65)</sup> また、ヒトへの感染例は東南アジアやエジプトを中心に増え続けており、600 名以上の患者が報告さ

れ、その致死率は約 60%におよんでいる。<sup>27)</sup> 従来ヒトから分離されている H5N1-HPAI ウイルスの HA は、鳥型の受容体である SA $\alpha$ 2-3Gal を認識していた。そのため、未だヒトからヒトへ効率良く伝播する性質は獲得していないと考えられていた。しかし、2006 年にはトルコでヒト型の受容体である SA $\alpha$ 2-6Gal を認識し、鳥より体温の低いヒトの呼吸器で増殖しやすい性質に変わったウイルスが分離された。<sup>66)</sup> このことから、H5N1-HPAI ウイルスがヒト-ヒト間の伝播能を獲得して新型インフルエンザとしてパンデミックを起こすことが危惧されている。また、2013 年に中国と台湾でヒトに感染した H7N9 鳥インフルエンザウイルスでは、これまでに 135 名の患者と 44 名の死者が確認されている。<sup>29,30)</sup> ヒトから分離されたすべての株において、NA の軸領域に 5 アミノ酸の欠損が認められたことから、<sup>67)</sup> これらのウイルスはヒトへの順化過程にあることが示唆される。さらに、この H7N9 鳥インフルエンザウイルスは鳥に対する病原性が低く、鳥の間での流行を監視することは難しい。ヒトの新型ウイルスを予測し、それに備えるため、鳥類におけるインフルエンザの疫学調査は極めて重要である。

当研究室では、鳥インフルエンザウイルスの生態を明らかにするため、2007 年から北海道各地で渡り鳥の糞便を採取してウイルス分離を試みている。2008 年には稚内で、H5N1-HPAI ウイルスと同じ亜型の A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) を分離した。そこで、本ウイルスと H5N1-HPAI ウイルスとの遺伝的関係を調べるため、全ゲノムの解析を試みた。

## 2) 材料及び方法

### (1) 細胞

イヌ腎由来株化細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞<sup>68)</sup>を用いた。細胞の培養には Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日水)に子ウシ血清を終濃度 10% (v/v), 硫酸ゲンタマイシン (和光純薬) を 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように加えたものを使用した。細胞の培養は 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で行った。

### (2) ウイルス分離

2007年 - 2012年の9月から11月にかけて、稚内市大沼, 北見市常磐公園, 月形町皆楽公園及び当別町中小屋においてカモ (主にマガモ: *Anas platyrhynchos* 及びコガモ: *A. crecca*) の糞便 1,856 検体及びハクチョウ (主にオオハクチョウ: *Cygnus cygnus*) の糞便 16 検体を採取した。これをペニシリン G (Sigma) 10,000 単位/ml, 硫酸ストレプトマイシン (Sigma) 10 mg/ml, 硫酸ゲンタマイシン 0.5 mg/ml を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) に 10~30% (v/v) となるように懸濁した。2,000×g で 10 分間遠心し, その上清 0.5~1 ml を 10 日齢発育鶏卵尿膜腔内に接種して 35°C で 2 日間培養した。V 底マイクロプレート上で尿液の 2 倍段階希釈液 (50  $\mu\text{l}$ ) を調製し, PBS で 0.5% (v/v) に調製したニワトリ赤血球を等量加えて攪拌した。これを氷上に 1 時間静置して赤血球の凝集を判定した。凝集活性陽性の尿液は PBS で希釈後 (1:10~1:100), 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを通して除菌し, 再度発育鶏卵に接種した。培養後回収した尿液が赤血球凝集活性を示したものをウイルス陽性とみなし, 以下の試験に供した。初回接種で凝集活性陰性の尿液は, 5~10 検体ずつまとめて再度発育鶏卵に接種した。陽性となったものは初回陽性検体と同様に処理した。

### (3) 逆転写反応及びウイルスゲノムの増幅

第1章第1節 2)-(3) に準じて二本鎖 cDNA を合成後, PCR を行った。

### (4) アガロースゲル電気泳動

第1章第1節 2)-(4) に準じてアガロースゲル電気泳動を行った。

## (5) DNA 断片の精製

第1章第1節2)-(5)に準じてDNA断片を精製した。

## (6) 塩基配列の決定及び系統進化解析

第1章第1節2)-(8)に準じて塩基配列を決定した。HA及びNA遺伝子の亜型はFWUni12/RVUni13プライマーを用いたダイレクトシーケンシングの結果により判別した。また、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1)の全ゲノムの塩基配列の決定にはTable 6に示すプライマーを用いた。プライマーの合成はファスマックに委託した。得られた塩基配列はneighbor-joining (N-J)法で解析し、系統樹の作成にはFigTreeソフトウェア(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>)を用いた。

## (7) プラーク形成試験

インフルエンザウイルスの病原性を推定するため、MDCK細胞でのプラーク形成試験をトリプシン存在/非存在下で実施した。12穴プレート(Nunc)で培養した細胞にウイルスを接種し、37°Cで1時間吸着させた後ウイルス液を除去した。これに1%アガロースを含むDMEMを重層し、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で2日間培養した。陽性対照として5µg/mlのトリプシンを含むアガロース加DMEMを用いた。0.1%ニュートラルレッドを重層し、37°Cに2~3時間放置して生細胞を染色した後、プラークを観察した。

**Table 6. Primers Used in this Chapter**

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Nucleotide position
PB1 gene		
AvPB1-F2	TCCCACCCAGGGATCTTTGAA	300-320
AvPB1-F3	ACACAAAGAACAATAGG	625-641
AvPB1-F4	TCCTTTACAATTACTGG	903-919
AvPB1-F5	AATGATGATGGGCATGTTC	1,226-1,244
AvPB1-F6	ATGGAGCTGCCAGCTTTGGAG	1,527-1,548
AvPB1-F7	TGTTGGTTTCAGATGGAG	1,774-1,791
AvPB1-F8	AGATGTACCAGAAGTGCTG	2,068-2,086
AvPB1-R1	AAAGCCATTGCTTCCAA	289-273
AvPB1-R2	AGACCGTTCGATCTGAAG	472-456
AvPB1-R3	TGCATCCCGGGTGTGCAA	648-630
AvPB1-R4	TTTGTTTGAGAACATTAT	1,048-1,032
AvPB1-R5	ATGAGAGCGAAATCATC	1,357-1,341
AvPB1-R6	TTGATGAATAGCTGAAG	1,666-1,650
AvPB1-R7	ACAGCATCATATTCCA	1,987-1,972
PB2 gene		
AvPB2-F2	ACAGTCCATTATCCAAAGG	335-353
AvPB2-F3	AAACCAGATTCCTACC	654-669
AvPB2-F4	TTCAAAAGGACAAGTGG	1,001-1,017
AvPB2-F5	ATGCAAAAGTGCTGTTTC	1,335-1,352
AvPB2-F6	ATGATGTGGGAAATCAA	1,616-1,632
AvPB2-F7	TCAGGAATGAGAATAC	1,940-1,955
AvPB2-F8	ACCAGCATTGAGCATC	2,128-2,143
AvPB2-R1	ATATTTTCATTGCCATCATC	178-160
AvPB2-R2	ACCTCCATGATGACATC	510-494
AvPB2-R3	TTGCTCTCCTAACAAT	824-809
AvPB2-R4	ACCATTGTGAATTCCTCATA	1,110-1,091
AvPB2-R5	TCTCAGTGACATCTCTG	1,441-1,425
AvPB2-R6	TCAAACCTCCATCTTATT	1,746-1,730
AvPB2-R7	TGTTCCCTCATCTGG	2,062-2,048
PA gene		
AvPA-F2	AGTATCTGCAACACCAC	286-302
AvPA-F3	TCCGAGAGAGGCGAAGAGAC	589-608
AvPA-F4	AATTAAGCATCGAAGACC	875-892
AvPA-F5	TATGACAGTGATGAACCAG	1,186-1,204
AvPA-F6	AAGACAAATCTGTATGG	1,498-1,514
AvPA-F7	TGTATGTGAGAACCAATGG	1,697-1,715
AvPA-F8	AGCTGAATCAAGAAAATTGC	1,986-2,005

**Table 6. (continued)**

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Nucleotide position
PA gene		
AvPA-R1	ATCCGAATACATGAAACAGAC	159-139
AvPA-R2	TGAATGAGAATATGTGAAT	460-442
AvPA-R3	TTCACTTCTTTTGACATTTG	770-751
AvPA-R4	TGGCTTGTTTTCTTCATGTT	1,003-984
AvPA-R5	ACTCCCTTCATTATGTATTC	1,397-1,378
AvPA-R6	ATACAGGAACATGGGCCTTGA	1,701-1,681
AvPA-R7	ATGGAGCCTTCCTCCAC	1,907-1,891
HA gene		
AvH5-F1	TGTAGCTGGATGGCTC	230-245
AvH5-F2	AATGCATACCCAACAATAAAGA	525-546
AvH5-F3	GCATACAAAATTGTCAAGAAAGG	820-841
AvH5-F4	AGTGGGTACGCTGCAGA	1,134-1,150
AvH5-F5	ACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA	1,444-1,465
AvH5-R1	GAGCCATCCAGCTACA	245-230
AvH5-R2	TCTTTATTGTTGGGTATGCATT	546-525
AvH5-R3	CCTTTCTTGACAATTTTGTATGC	841-820
AvH5-R4	TCTGCAGCGTACCCACT	1,150-1,134
AvH5-R5	TGATAGAACTCGAAACAACCGT	1,465-1,444
NP gene		
AvNP-F1	AAGAACACCCCAGTGCG	269-285
AvNP-F2	GTGCAGCAGTAAAGGG	569-584
AvNP-F3	GTAGCCAGTGGATATGACTT	883-902
AvNP-F4	TTGGGCTATAAGAACCAGAAG	1,186-1,205
AvNP-R1	CGCACTGGGGTGTTCCT	285-269
AvNP-R2	CCCTTTACTGCTGCAC	584-569
AvNP-R3	AAGTCATATCCACTGGCTAC	902-883
AvNP-R4	CTTCTGGTTCTTATAGCCCAA	1,205-1,186
NA gene		
AvN1-F1	AGCGGGCAATTCATCTCTTT	260-279
AvN1-F2	GTTGGTTGACAATTGGAATTTCT	571-593
AvN1-F3	AGGGATAATTGGCATGGCTC	882-901
AvN1-F4	AAGATATCGTAGCAATAACTGA	1,177-1,198
AvN1-R1	AAAGAGATGAATTGCCCGCT	279-260
AvN1-R2	AGAAATTCCAATTGTCAACCAAC	593-571
AvN1-R3	GAGCCATGCCAATTATCCCT	901-882
AvN1-R4	TCAGTTATTGCTACGATATCTT	1,198-1,177

**Table 6. (continued)**

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Nucleotide position
M gene		
AvM-F1	AGGACTGCAGCGTAGA	217-232
AvM-F2	CACTTGTGAGCAGATTGC	448-465
AvM-F3	CAGCGATTCAAGTGATCCT	746-764
AvM-R1	TCTACGCTGCAGTCCT	232-217
AvM-R2	GCAATCTGCTCACAAGTG	465-448
AvM-R3	AGGATCACTTGAATCGCTG	764-746
NS gene		
AvNS-F1	AGGATGTCAAAAATGCAATTGG	515-536
AvNS-R1	CCAATTGCATTTTTGACATCCT	536-515

Nucleotide positions are numbered according to the PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS gene of A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1) (Gene Bank; accession number AB530989 - 530996).

### 3) 結果

(1) 2007-2012年に北海道内で分離された鳥インフルエンザウイルスの亜型判別

2007年から2012年に稚内市、北見市、月形町及び当別町で採取したカモ糞便 1,856 検体及びハクチョウ糞便 16 検体を 10 日齢発育鶏卵に接種し、培養後の尿液の赤血球凝集活性を調べた。陽性尿液を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過し、再接種後に赤血球凝集活性が認められたものをウイルス陽性とみなした。1,872 検体を調べた結果、36 検体から赤血球凝集因子が分離された。分離ウイルス感染鶏卵の尿液から RNA を抽出して第 1 章第 1 節で開発した A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法に供したところ、34 検体で複数の DNA 断片が増幅された。各々の HA 及び NA 遺伝子に相当する 1.8kb 及び 1.5kb の断片を精製して塩基配列を決定し、Blast 解析に供して亜型の判別を行った。その結果、34 検体から H1N1, H1N2, H2N3, H3N8, H4N6, H5N1, H5N2, H6N2, H6N8, H9N2, H10N2, H10N9, H11N3 及び H12N5 亜型の 14 種類のウイルスが検出された。採取年ごとの陽性率は、2009 年が最も高く 3.9% (10/257)、2007-2008 年及び 2010-2012 年は 1.2-1.8%であった (Table 7)。宿主別の陽性率は、カモが 1.6% (30/1,856)、ハクチョウが 25% (4/16)であった。ハクチョウのウイルスはいずれも 2009 年の同日に月形町で採取した糞便から分離されたものであり、すべて H6N8 亜型であったことから同一個体に由来する可能性がある。

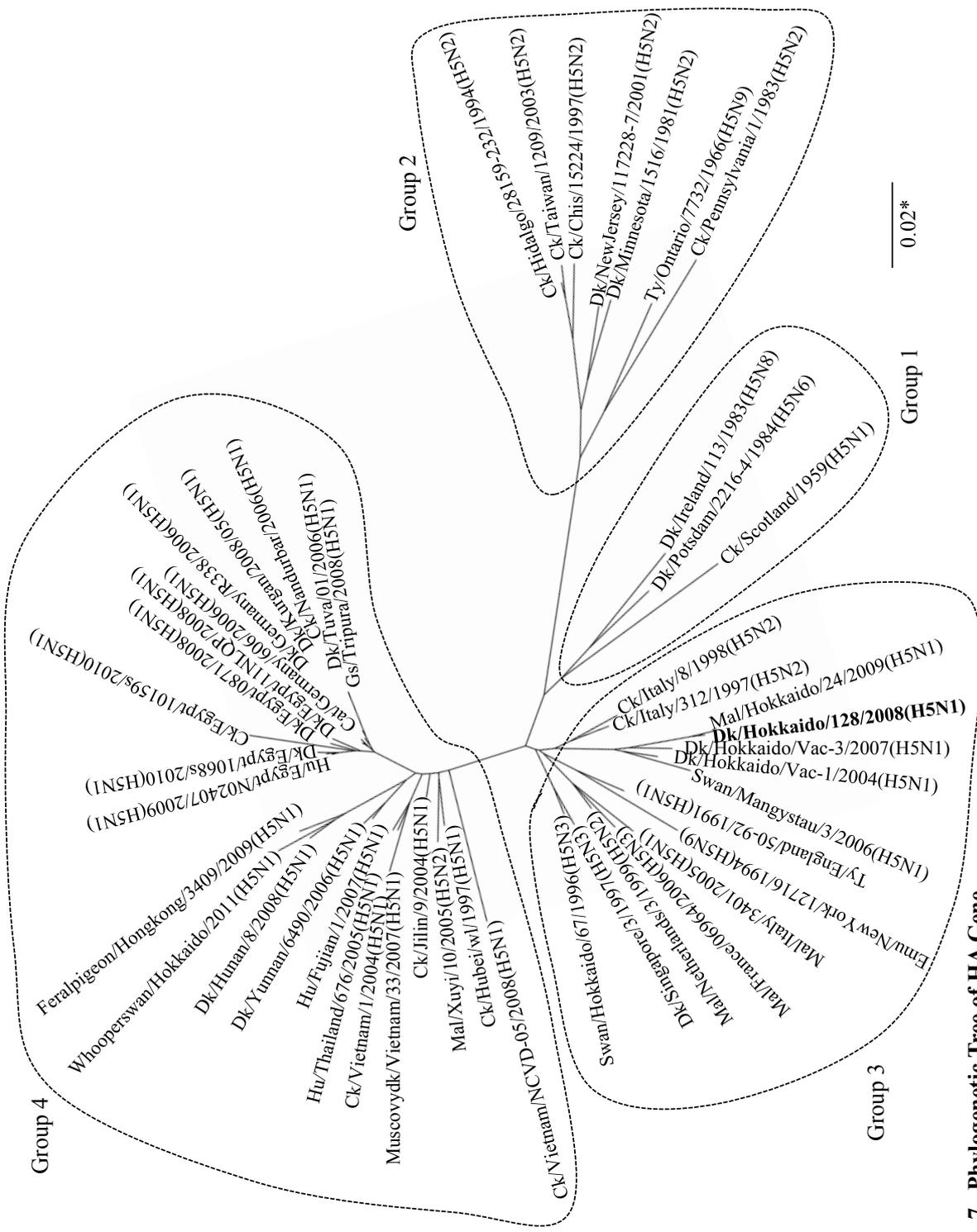
鳥類の間には、赤血球凝集ウイルスとしてニューカッスル病ウイルスを始めとするパラミクソウイルスが分布している。<sup>69)</sup>そこで、赤血球凝集活性を示したものの A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法によって DNA 断片が増幅されなかった 2 検体について、ニューカッスル病ウイルス膜融合タンパク質 (F) 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、DNA 断片が増幅され、そこに F 遺伝子の配列が検出されたことから、両株ともニューカッスル病ウイルスであることが確認された。

**Table 7. Subtype of Field Isolates**

Subtype	2007	2008	2009	2010	2011	2012
H1N1	4					
H1N2			1			
H2N3				2		
H3N8			3		4	1
H4N6			1			
H5N1		1				
H5N2				2		
H6N2					1	3
H6N8			4			
H9N2		1				1
H10N2		1				
H10N9		1				
H11N3						1
H12N5	1		1			
No. of virus / no. of sample (%)	5/278 (1.8)	4/248 (1.6)	10/257 (3.9)	4/321 (1.2)	5/367 (1.4)	6/401 (1.5)

## (2) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA 遺伝子の系統進化解析とアミノ酸の比較

H5N1-HPAI ウイルスと同じ亜型のウイルス A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) が 2008 年に稚内で分離された。この HA 遺伝子全長の塩基配列を決定し、得られた塩基配列を世界中で分離された H5 亜型の HA 遺伝子とともに N-J 法に供した。系統進化解析の結果、H5 亜型の HA 遺伝子は 4 つのグループに分類できた (Fig. 7)。グループ 1 には 1980 年代以前のヨーロッパで分離された低病原性株と高病原性株が含まれた。グループ 2 にはアメリカ大陸で分離された多くの低病原性株と 1983 年にペンシルベニア州で発生した高病原性株が含まれた。これらの多くは病原性に関わらず N2 亜型の NA 遺伝子を伴っていた。グループ 3 には 1990 年以降のアジア及びヨーロッパで分離された株が含まれた。2008 年に稚内で分離された H5N1 亜型ウイルスはこのグループに含まれ、2009 年に北海道のマガモから分離されたウイルスと最も近縁であった。低病原性株では N1 ないし N3 亜型の NA 遺伝子を伴うものが多く、高病原性株はいずれも N2 亜型の NA 遺伝子を伴っていた。グループ 4 には 1996 年以降のアジア、ヨーロッパ及びアフリカで分離された



**Fig. 7. Phylogenetic Tree of HA Gene**  
 Ck; Chicken, Dk; Duck, Gs; Goose, Hu; Human, Ma; Mallard, Sw; Swine, Ty; Turkey. \*evolutionary distance

高病原性株が含まれた。これらは全て N1 亜型の NA 遺伝子を伴っていた。

HA 遺伝子の塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、今回調べた H5N1 亜型ウイルスの HA の開裂部位には連続する塩基性アミノ酸は認められなかった (Table 8)。このことから、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) は低病原性株であると予想された。また、受容体特異性に関与すると考えられている 182 及び 192 番アミノ酸は各々アスパラギン及びグルタミンであった (Table 9)。したがって、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA は、鳥型受容体である SA  $\alpha$  2-3Gal を認識するものと考えられた。

**Table 8. Amino Acid Sequence of Flanking Cleavage Site of H5 HA Gene**

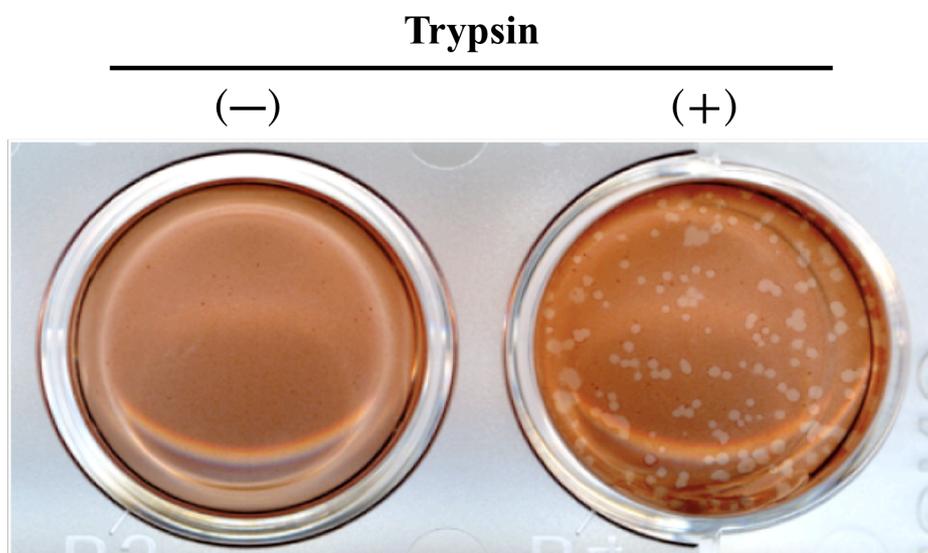
Virus	Amino acid										Pathogenicity	
	Cleavage site											
A/duck/Hokkaido/128/2008	P	Q	-	-	-	-	R	E	T	R	G	
A/mallard/Hokkaido/24/2009	P	Q	-	-	-	-	R	E	T	R	G	Low
A/duck/HongKong/p46/1997	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	High
A/chicken/Vietnam/1/2004	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	High
A/duck/Egypt/0871/2008	P	Q	G	E	K	R	R	K	K	R	G	High
A/Fujian/1/2007	P	L	R	E	R	R	R	K	-	R	G	High

**Table 9. Amino Acid Sequence of Receptor Binding Site of H5N1 Virus**

Virus	Amino acid position		Binding specificity <sup>51)</sup>
	182	192	
A/duck/Hokkaido/128/2008	N	Q	
A/ Vietnam/1194/2004	N	Q	SA $\alpha$ 2-3Gal >>> SA $\alpha$ 2-6Gal
A/Vietnam/1194/2004 N182K	K	Q	SA $\alpha$ 2-3Gal = SA $\alpha$ 2-6Gal
A/Vietnam/3208II/2004clone3	N	R	SA $\alpha$ 2-3Gal = SA $\alpha$ 2-6Gal
A/Thailand/1-KAN-1/2004	K	Q	SA $\alpha$ 2-3Gal = SA $\alpha$ 2-6Gal

### (3) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) のトリプシン依存性増殖

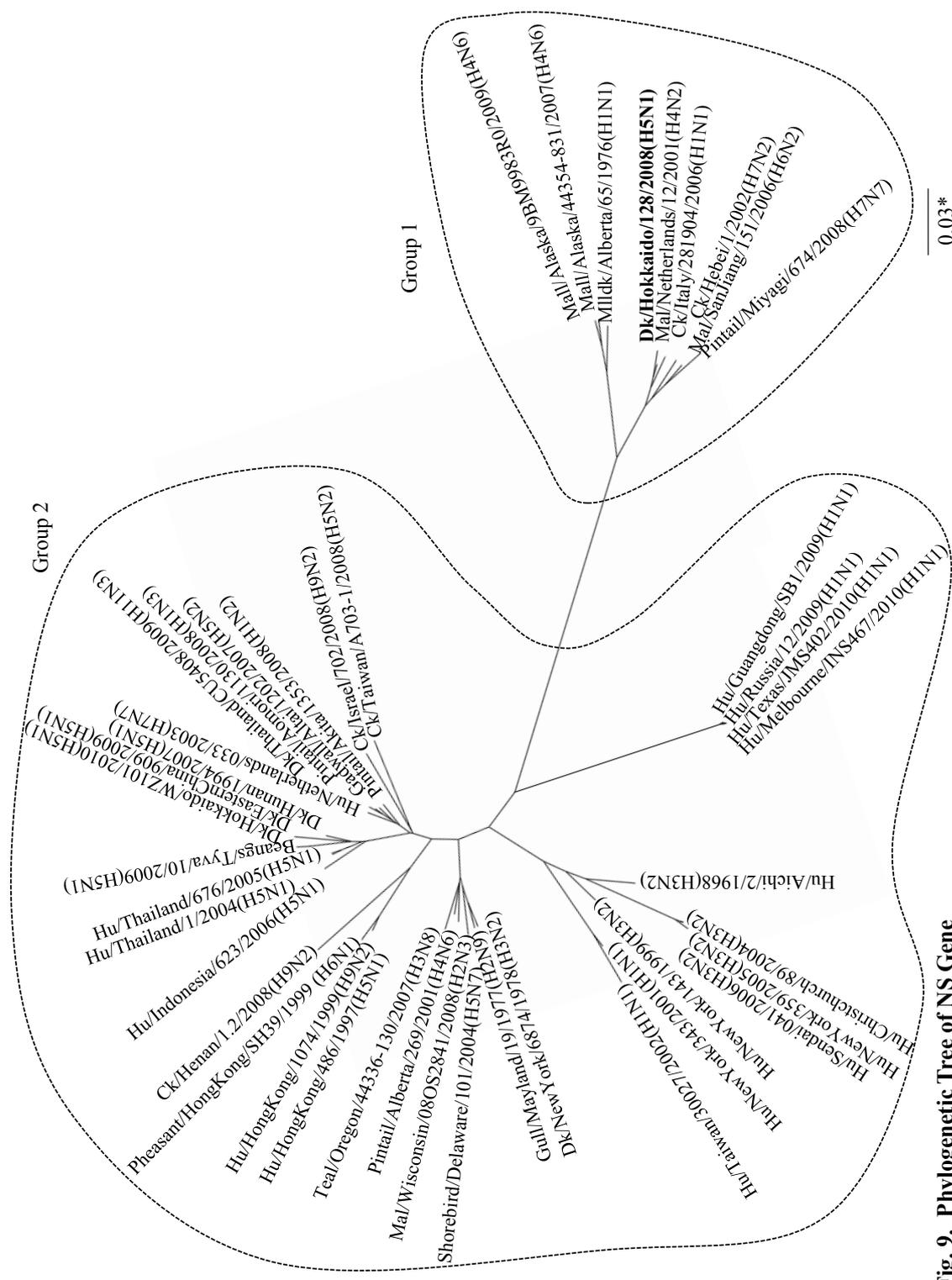
H5N1 ウイルスの HA は細胞内に普遍的に存在するタンパク質分解酵素で開裂活性化するため、MDCK 細胞での増殖にトリプシンを要しない。一方、低病原性 H5 亜型を含む低病原性ウイルスの HA はトリプシン様タンパク質分解酵素によって開裂し、活性化する。そこで A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の病原性を推定するため、トリプシン非存在下でのプラーク形成能を調べた。Fig. 8 に示すように、本分離株はトリプシン存在下ではプラークを形成したが、非存在下ではプラークを形成しなかった。したがって、本ウイルス株はニワトリで全身感染を起こすことのない低病原性株と考えられた。



**Fig. 8. Plaque Formation by A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) in the Presence or Absence of Trypsin**

### (4) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の NS 遺伝子の系統進化解析とアミノ酸の比較

A 型インフルエンザウイルスの NS 遺伝子は 2 つのアレルに分かれ、宿主域と密接に関係することが知られている。<sup>70)</sup> そこで、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の NS 遺伝子の系統進化解析を行った。その結果、NS 遺伝子は鳥ウイルスのみのグループ 1 とヒトウイルスを含むグループ 2 の大きく 2 つのアレルに分けられた (Fig. 9)。それぞれのグルー



**Fig. 9. Phylogenetic Tree of NS Gene**  
 Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine. \*evolutionary distance

プに属する鳥ウイルスはさらに、ユーラシア・アフリカ大陸鳥由来ウイルスの系統とアメリカ大陸鳥由来ウイルスの系統に分けられた。A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) は、グループ 1 のユーラシア・アフリカ大陸鳥由来ウイルスの系統に属した。

A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の NS 遺伝子塩基配列から NS1 のアミノ酸配列を推定した。病原性に関与すると考えられているアミノ酸のうち、92 番、106 番及び 149 番アミノ酸はそれぞれ野生型のアスパラギン酸、メチオニン及びアラニンであった。一方、42 番及び 103 番アミノ酸は野生型のセリンからアラニン及びフェニルアラニンからチロシンへの変異であり、病原性を強めるプロリン及びロイシンとは異なる変異であった (Table 10)。

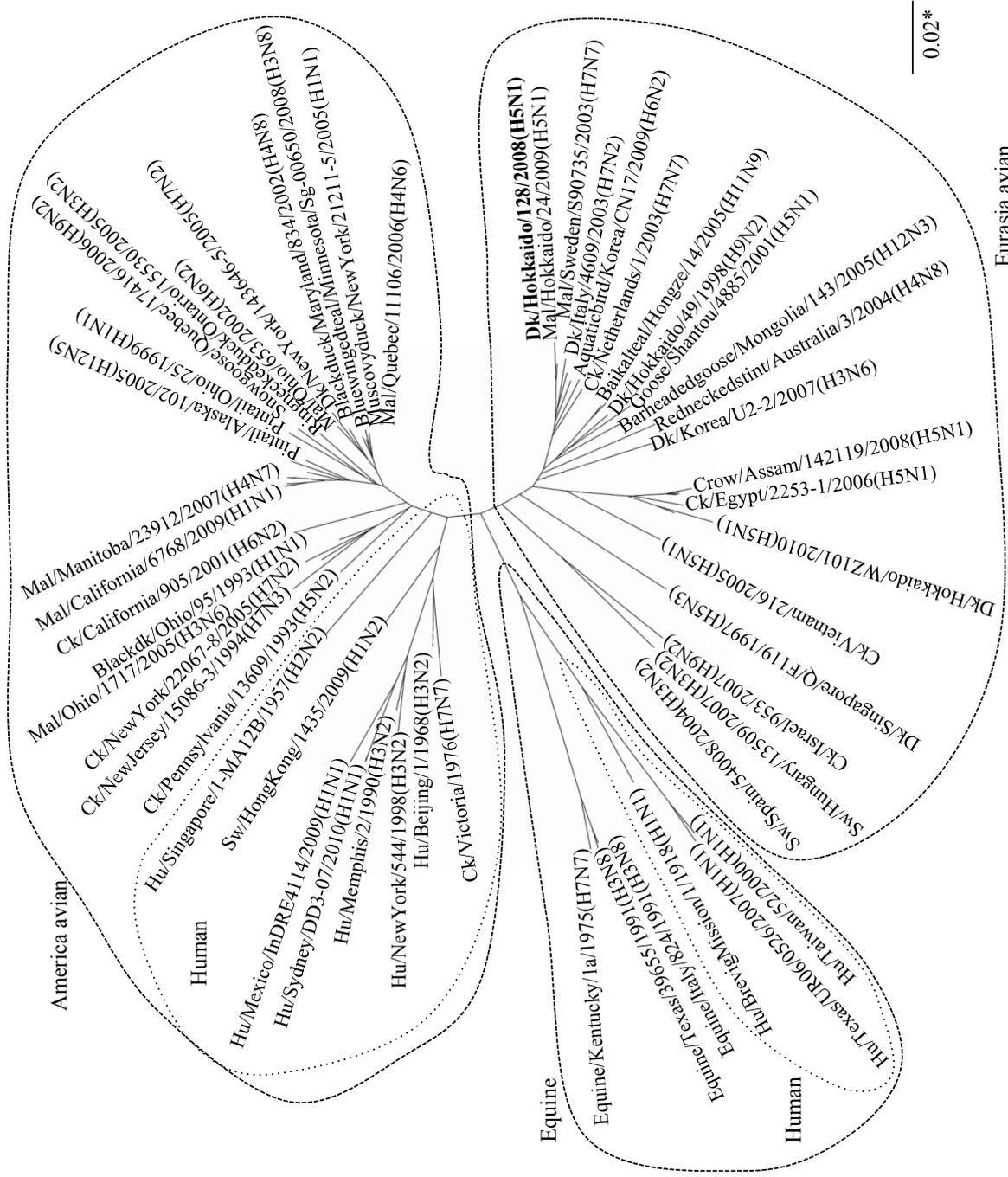
**Table 10. Amino Acid Sequence of NS1**

Virus	Amino acid position					Pathogenicity
	42	92	103	106	149	
A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1)	A	D	Y	M	A	
A/mallard/Netherlands/12/2001 (H4N2)	A	D	Y	M	A	Low
A/pintail/Alberta/269/2001 (H4N6)	S	D	F	M	A	Low
A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1)	S	D	F	M	A	Low
A/goose/Guangdong/2/1996 (H5N1)	S	D	F	M	V	Low
A/duck/Guangxi/27/2003 (H5N1) NS1 S42P	P	D	F	M	A	High
A/HongKong/156/1997 (H5N1)	S	E	L	I	A	High
A/Russia/12/2009 (H1N1)	S	D	F	M	A	Low

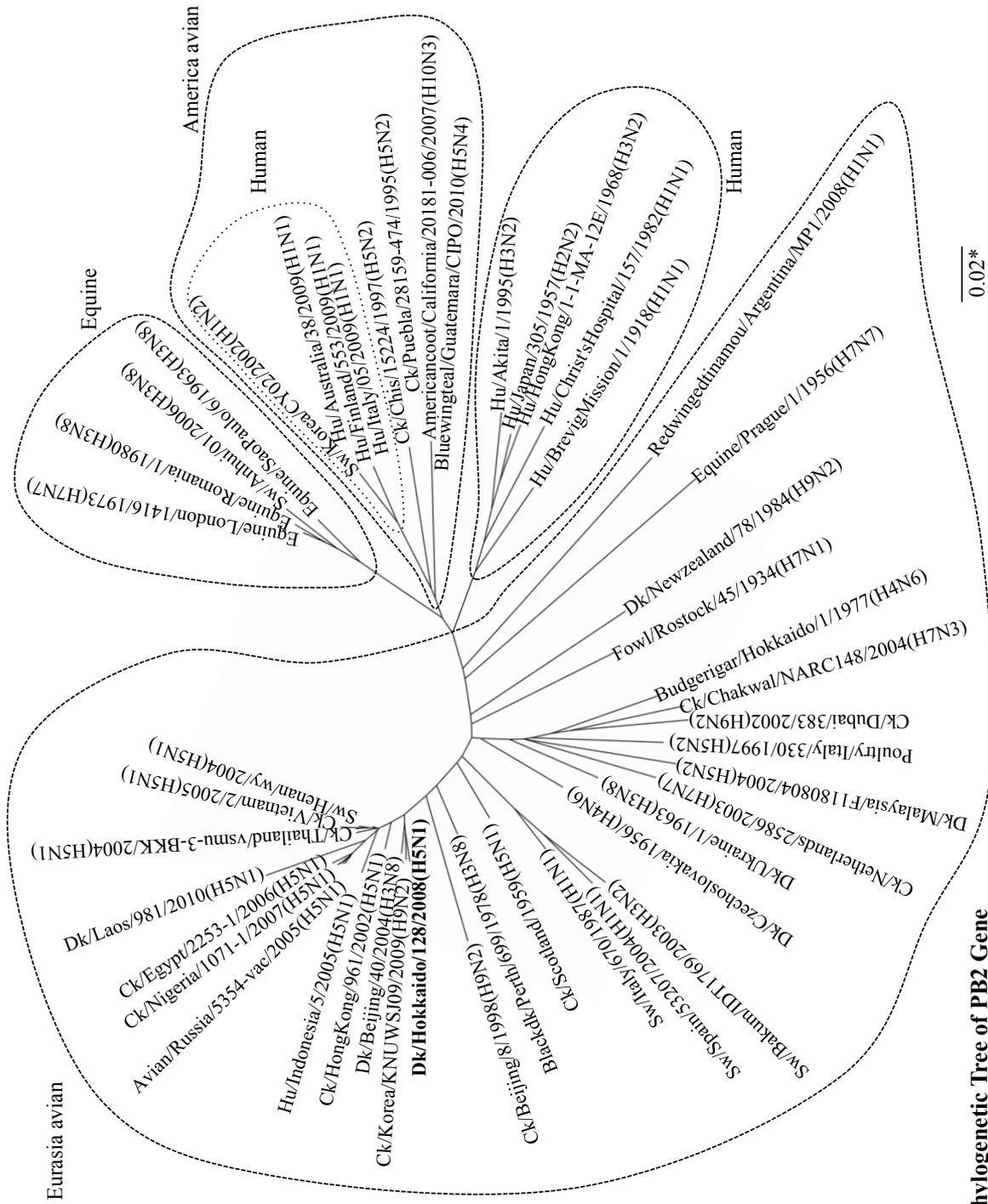
#### (5) A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の PB1, PB2, PA, NP, NA 及び M 遺伝子の系統進化解析とアミノ酸の比較

A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA 及び NS 遺伝子を除く 6 遺伝子分節 PB1, PB2, PA, NP, NA 及び M 遺伝子の全長の塩基配列を決定し、遺伝子ごとに系統進化解析を行った。いずれの遺伝子においてもアメリカ大陸鳥由来ウイルス、ユーラシア大陸鳥由来ウイルス、ヒトウイルス及びウマウイルスに大別された (Figs. 10-15)。PB1 遺伝子ではヒト由来のウイルスがウマ由来ウイルス及び鳥由来ウイルスと同一のグループに含まれた。PB2, PA, NP 及び M 遺伝子では、一部のヒト由来ウイルスはアメリカ大陸鳥由来ウイルスのグループに含まれた。また、ブタから分離されたウイルスはヒトウイルスと近縁なものが多かったが、鳥由来ウイルスのグループに含まれるものもあった。この成績は、ヒト及び鳥類からブタへのウイルス感染が高頻度に起きていることを示しており、遺伝子再集合体産生による新型インフルエンザウイルス出現の危険性を示唆している。一方、今回調べた A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の遺伝子は、いずれもユーラシア鳥由来ウイルスのグループに属していた。

A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の PB2 の 627 番アミノ酸は、野生型のグルタミン酸であった。したがって、ウイルス増殖最適温度は鳥類の体温であると考えられた。また、病原性への関与が報告されている 701 番アミノ酸に特徴的な変異は認められなかった。抗ウイルス薬の標的である NA では、オセルタミビル耐性マーカーである NA の 275 番アミノ酸の変異は認められなかった。さらに、NA 軸領域のアミノ酸に欠損は確認されなかった。

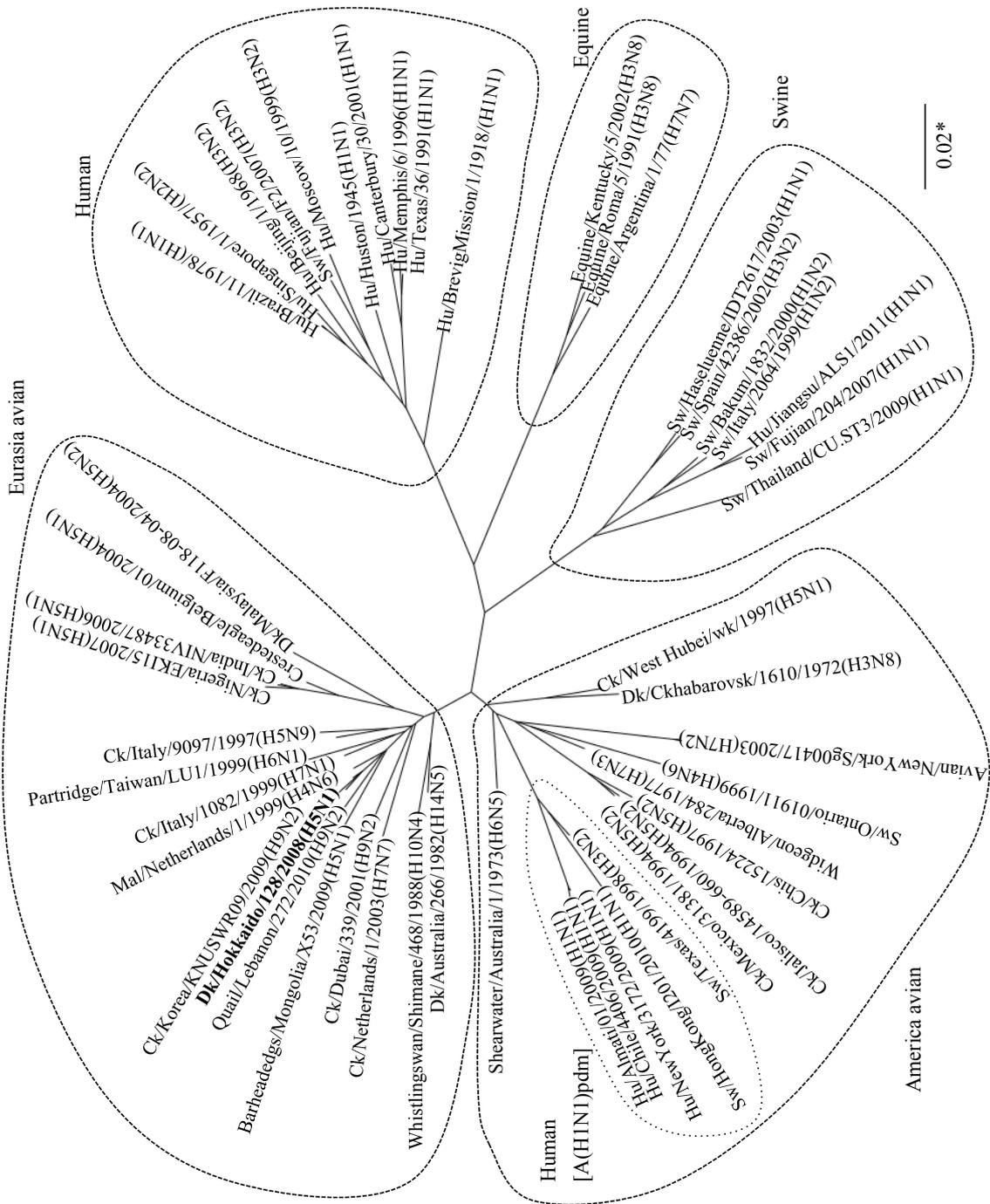


**Fig. 10. Phylogenetic Tree of PB1 Gene**  
 Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine. \*evolutionary distance

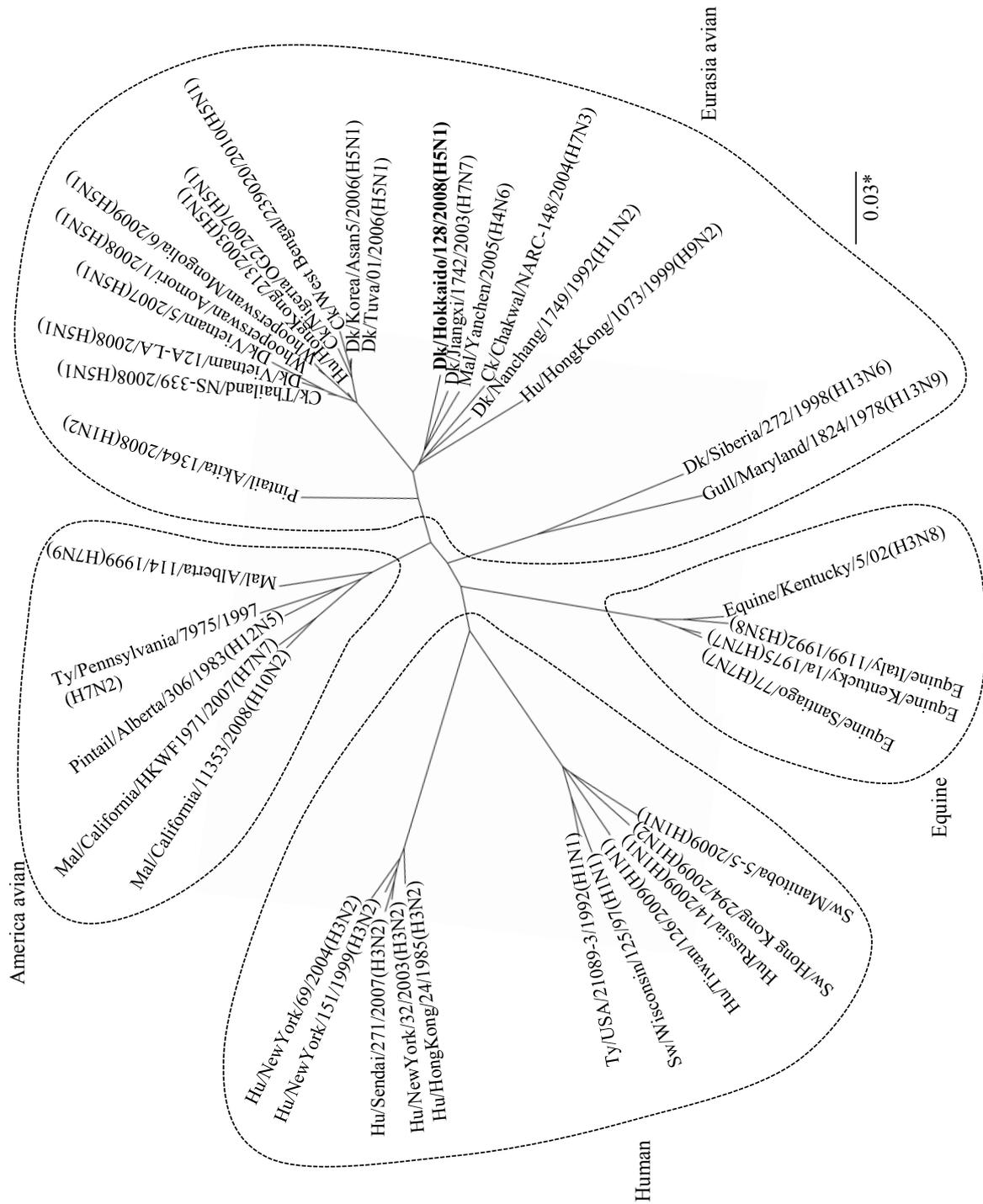


0.02\*

**Fig. 11. Phylogenetic Tree of PB2 Gene**  
 Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine. \*evolutionary distance

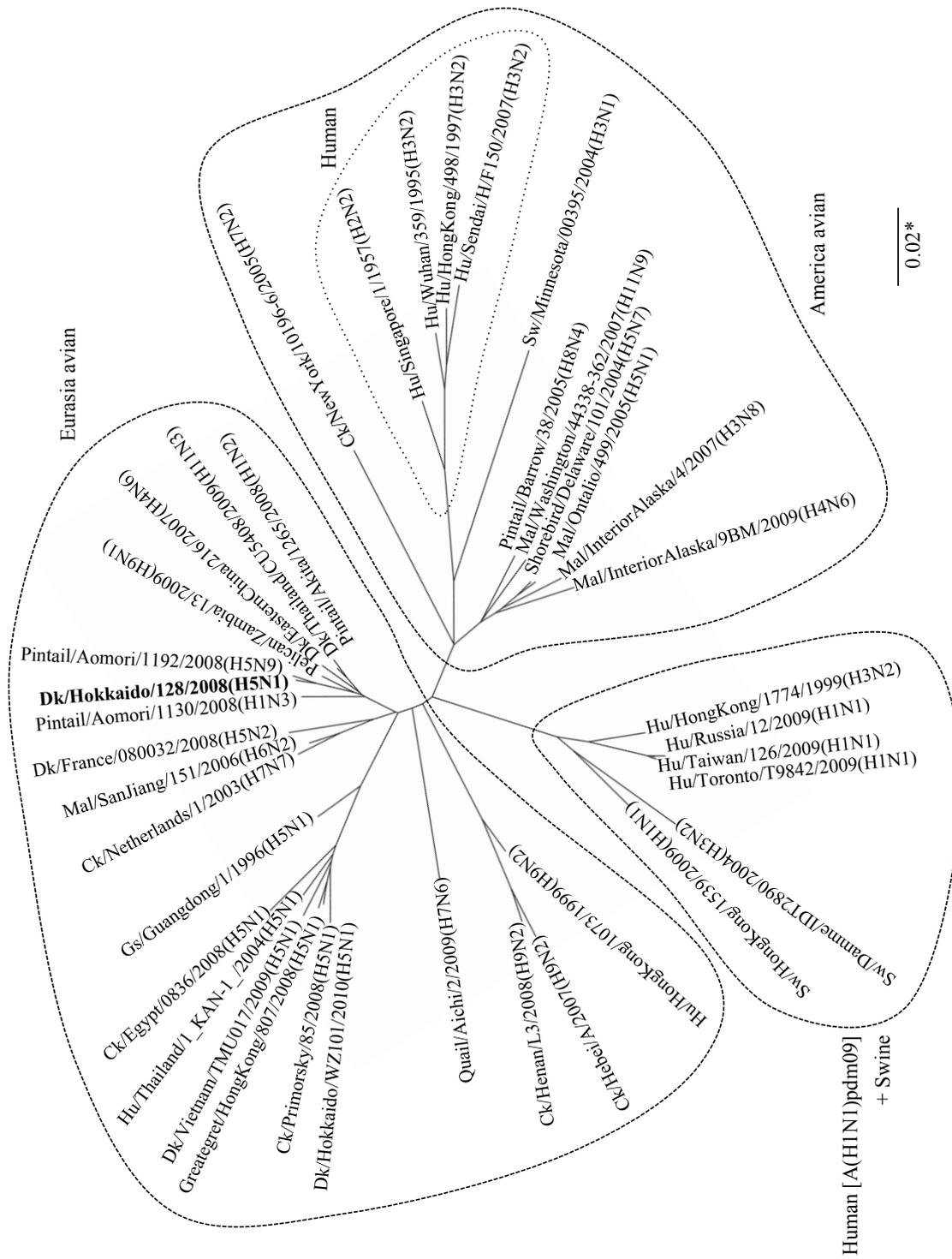


**Fig. 12. Phylogenetic Tree of PA Gene**  
 Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine. \* evolutionary distance



**Fig. 13. Phylogenetic Tree of NP Gene**  
 Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine, Ty; Turkey. \*evolutionary distance





**Fig. 15. Phylogenetic Tree of M Gene**

Ck;Chicken, Dk;Duck, Hu;Human, Mal;Mallard, Sw;Swine. \*evolutionary distance

#### 4) 考察

今回、カモ糞便 1,856 検体及びハクチョウ糞便 16 検体から 36 株の赤血球凝集ウイルスが分離された。第 1 章第 1 節で開発した A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法に供したところ、34 株で複数の DNA 断片が増幅された。したがって、これらの 34 株は A 型インフルエンザウイルスであると推定された。そこで、ウイルス感染鶏卵尿液から増幅された 1.8kb 及び 1.5kb の断片を鋳型とし、FWUni12 及び RVUni13 をプライマーとして用いてダイレクトシーケンシングを行った。その結果、34 株すべての亜型を判別することに成功し、A 型インフルエンザウイルスであることが確認された。分離されたウイルスの亜型は 14 種と様々であり、北海道に飛来する渡りガモが様々な亜型の A 型インフルエンザウイルスに感染していることが確認できた。1991-1994 年にアラスカで実施された野鳥の糞便採取による疫学調査では 108 株で 8 種類、1995-1998 年にシベリアで行われた同様の調査では 38 株で 7 種類の亜型の組み合わせが認められ、両地域とも H3N8 及び H4N6 亜型の割合が高かった。<sup>16, 71)</sup> 一方、1996-1998 年の稚内における調査では 10 株で 9 種類、2005-2008 年のカリフォルニアにおける調査では 69 株で 28 種類の亜型が認められた。<sup>71, 72)</sup> したがって、アラスカやシベリア等の各営巣地から運ばれたウイルスが、カモの渡りの経由地で異なる亜型ウイルスに感染しているカモに感染し、遺伝子再集合を起こして多様な組み合わせの亜型ウイルスが生じていることが示唆された。

2008 年に稚内で分離された H5N1 ウイルス A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA 遺伝子の塩基配列を決定して系統進化解析を行った。その結果、H5 亜型インフルエンザウイルスは 4 グループに分類された。HA の開裂部位に塩基性アミノ酸が連続するウイルスを高病原性としたところ、グループ 4 の高病原性株は全て N1 亜型 NA を伴っていたが、その他のグループの高病原性株では N2 亜型が多く、N8 亜型も含まれた。これまでヒトへの感染が報告されている H5 亜型 HPAI ウイルスはグループ 4 のウイルスのみである。したがって、N1 亜型 NA がヒトへの感染性に影響している可能性がある。HA の受容体特異性のみならず、N1 亜型 NA の受容体破壊活性と高病原性 H5 亜型 HA の受容体結合活性のバランスがヒトへの感染性に重要なかもしれない。

A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA のアミノ酸を調べたところ、受容体結合特異性に関与するアミノ酸に変異は認められなかった。一方、Table 9 に示すように、182 番アミノ酸がリシンに変異した A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 及び A/Thailand/1-KAN-1/2004

(H5N1) ならびに 192 番アミノ酸がアルギニンに変異した A/Vietnam/3208 II/2004clone3 (H5N1) では、ヒト型受容体である SA $\alpha$ 2-6Gal に対する親和性が增大する。<sup>51)</sup> また、ウイルスの増殖至適温度に影響する PB2 の 627 番アミノ酸は野生型のグルタミン酸であった。さらに、宿主域を規定する NS 遺伝子も鳥ウイルスのアレルであった。したがって、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) はヒトに感染する恐れは少ないと考えられた。

HA の開裂部位に塩基性アミノ酸が連続して存在する場合、HA は全身の細胞に普遍的に存在するタンパク質分解酵素によって開裂・活性化する。そのため、ウイルスは全身で増殖して強い病原性を発揮する。A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) の HA の開裂部位に連続する塩基性アミノ酸は認められなかった。さらに、本ウイルスは MDCK 細胞での増殖においてトリプシンを要求した。また、NA 軸領域にアミノ酸の欠損は認められなかった。これらのことから、A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) は低病原性株と考えられた。

HA 及び NS 遺伝子を除く A 型インフルエンザウイルスの 6 遺伝子分節について系統進化解析を行ったところ、遺伝子ごとに異なる系統進化を示すことが分かった。すなわち、アジアかぜ及び香港かぜの原因ウイルスの PB1 遺伝子はアメリカ大陸鳥由来ウイルスのグループに含まれた。これは、アジアかぜ及び香港かぜの原因ウイルスの PB1 遺伝子は鳥ウイルス由来であるという報告<sup>73)</sup> と一致する。また、A (H1N1) pdm09 は、北米アメリカで流行していたブタのトリプル遺伝子交雑体ウイルスとユーラシアブタウイルスとの遺伝子再集合体であった。<sup>74)</sup> 本研究においても、A (H1N1) pdm09 の PB1 遺伝子はヒトの香港かぜ H3N2 ウイルスに由来し、PB2 及び PA 遺伝子はアメリカ大陸鳥由来ウイルスのグループに含まれ、NP、NA 及び M 遺伝子はいずれもブタウイルスと近縁であることが認められた。したがって、これらの遺伝子分節は宿主特異性が低いものと考えられる。一方、NP 遺伝子ではヒトウイルスと鳥由来ウイルスのグループが完全に分けられた。このことから、NP 遺伝子分節は宿主特異性が高いことが示唆された。

2008 年に稚内で分離された H5N1 ウイルス A/duck/Hokkaido/128/2008 (H5N1) はヒトに感染する恐れが少ない低病原性株であると推察された。しかしながら、H5 及び H7 ウイルスは家禽の間で感染を繰り返すことによって HA の開裂部位に変異が生じて強毒化する可能性がある。また、NP 遺伝子を除く遺伝子分節の多くは動物種を越えて容易に入れ替わることが分かった。新型インフルエンザウイルスの出現に備えるため、すべての A 型インフルエンザウイルスの起源である鳥インフルエンザウイルスに対する十分な監視を継続する必要がある。

## 第2章 北海道医療大学における新型 H1N1 インフルエンザウイルスの分子疫学

### 第1節 本学クリニックで分離された新型 H1N1 インフルエンザウイルス HA 及び NA 遺伝子の系統進化解析

#### 1) 緒言

2009年3月にメキシコで発生したブタ由来の A (H1N1) pdm09 は、世界各地で瞬く間に流行が拡大し、6月には WHO が 21 世紀最初のパンデミックを宣言した。日本では、5月に成田空港においてカナダからの帰国者で初めてウイルスが検出された。その後、関西地区で高校生を中心とした集団発生が起き、6月中旬以降は全国の中高校生を中心とした 20 歳以下の若年者の間に感染が拡大していった。11月には流行がピークに達し、2010年3月の時点で全国の推定患者数は 2,100 万人、死者は 198 名であった。<sup>75)</sup> 本学においては、10月と11月に複数の学部・学科で学年閉鎖処置が執られた。A (H1N1) pdm09 はこれまでの季節性インフルエンザウイルスに比べて病原性は低いものの、肺組織へのより強い親和性があり、その病原性の変化が注視されている。<sup>76)</sup>

1998 年以降、北米のブタの間でブタ由来 H1N1 ウイルス、北米系鳥由来 H1N1 ウイルス及びヒト由来 H3N2 ウイルスのトリプル遺伝子再集合体 (H1N2) が流行していた。このウイルスとユーラシア系鳥由来ブタウイルスの遺伝子再集合体がブタの間で流行し、その後、ヒトに侵入して A (H1N1) pdm09 が発生したと考えられている。A (H1N1) pdm09 の PB1, PB2, PA, HA, NP 及び NS 遺伝子は北米ブタのトリプル遺伝子再集合体由来であり、NA 及び M 遺伝子はユーラシア系鳥由来ブタウイルスに由来する。<sup>24)</sup> また、全ゲノムの系統進化解析によって、A (H1N1) pdm09 は 7 つのクレードに分類されることが明らかとなっている。<sup>77)</sup>

インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着・侵入を担う HA は、ヒトの免疫応答の主要な標的となる。そのため、遺伝子変異中の非同義置換の頻度が高く、連続的な抗原性の変異が顕著で、しばしばワクチン株の選定等に支障をきたしている。抗原性の解析はフェレットの感染血清あるいはモノクローナル抗体を用いて行われるが、これらを常備している施設は限られる。H1, H2, H3 及び H5 亜型 HA では抗原決定基の解析が進んでおり、HA 遺伝子の解析によって抗原変異を推定することが可能である。また、遺伝

子解析結果から受容体結合部位のアミノ酸を推定することによって HA の受容体特異性を予測することができる。さらに、H5 及び H7 亜型における高病原性ウイルスでは開裂部位に塩基性アミノ酸が連続して存在するので、<sup>47)</sup> HA の開裂部位のアミノ酸配列から病原性を推定することも可能である。

今日、インフルエンザの治療薬としては、アマンタジンの他、2001年に認可されたザナミビルやリン酸オセルタミビル、2010年に認可されたラニナビルやペラミビルが上市されている。アマンタジンは A 型ウイルスの M2 イオンチャネルを阻害することによってウイルスの増殖を抑制するが、耐性株が出現しやすく国内で用いられることはほとんどない。一方、他の 4 剤はいずれも NA 阻害剤であり、A 型ウイルスのみならず B 型ウイルスに対しても抗ウイルス作用を示す。NA はシアリダーゼ活性を担う頭頂部と膜貫通部分を含む軸部分に分けられ、ウイルスエンベロープ上の糖タンパク質に付加されたシアル酸を除去することによってウイルス粒子の凝集を防ぎ、また、出芽の際に宿主細胞上の受容体を破壊することによって粒子の放出を助ける。<sup>5)</sup> NA 阻害剤は NA の活性部位に結合して受容体破壊活性を阻害し、ウイルス粒子の放出を妨げ、あるいは凝集を生じさせることによって未感染細胞への感染、伝播を防ぐ。

2007 年後半から、季節性 H1N1 ウイルス NA の 275 番アミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異 (H275Y) し、オセルタミビルに対して耐性になった株がノルウェーを始め世界各地で高頻度に検出されるようになった。<sup>78)</sup> 幸い H275Y 変異株はザナミビルに対する耐性は示さなかったが、医療機関における抗インフルエンザ薬の選択に大きな影響を及ぼした。2009 年 3 月時点で確認されていた季節性 H1N1 ウイルスのオセルタミビル耐性株の割合は、アメリカで 97%、EU 諸国で 98%、韓国で 99%、台湾で 100%、オーストラリア、中央アメリカ、アフリカ諸国で 80~100%であった。<sup>79)</sup> 日本での耐性株検出頻度は、2007/2008 のインフルエンザシーズンでは 2.6%と諸外国に比べ極めて低い状況であった。しかしながら、2008/2009 シーズンになると耐性株が相次いで検出され、その頻度は 99.6%にのぼった。<sup>80)</sup> 一方、世界各国で分離されている A (H1N1) pdm09 の多くは NA 阻害剤に感受性であるが、散発的に H275Y 変異を持つオセルタミビル耐性株が検出されている。<sup>81)</sup> また、NA の軸領域に欠損を有する H5N1-HPAI ウイルスは、マウスに対する病原性が高くなることが報告され、<sup>53)</sup> 同様の変異が 2013 年にヒトへの感染が確認された H7N9 鳥インフルエンザウイルスにも認められている。<sup>67)</sup>

以上のように、インフルエンザウイルスのスパイク糖タンパク質 HA 及び NA 遺伝子

の解析は、ヒトにおけるウイルスの増殖能、病原性、ワクチン開発及び治療薬の開発・選択に極めて重要である。本節では、本学における A (H1N1) pdm09 の流行状態を明らかにするため、本学クリニックで分離されたウイルス株の HA 及び NA 遺伝子について系統進化解析を行った。

## 2) 材料及び方法

### (1) 細胞

第1章第2節2)-(1)に示した細胞を用いた。

### (2) 患者試料

2009年9月から12月にかけて北海道医療大学歯科内科クリニックにおいて、インフルエンザ迅速診断キット(イムノエースFlu: タウンズ)でA型インフルエンザ陽性を示した患者から鼻腔スワブを採取した。患者のほとんどは本学学生または研修医であった。スワブは1%BSA及び50 µg/ml 硫酸ゲンタマイシンを含むDMEM(ウイルス分離液) 1 mlに浸漬し、氷中に保存した。また、期間中に当クリニックにおいて処方された抗インフルエンザ薬(タミフル®及びリレンザ®)の処方枚数を集計した。なお、これらの操作や患者の同意取得は、北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会に申請、許可された研究計画に基づいて行った。

### (3) ウイルス分離

鼻腔スワブを浸漬したウイルス分離液を採取後3時間以内に遠心して上清を得た。直ちにその0.2 mlを24穴プレート(Nunc)中の2穴のMDCK細胞に接種し、35°Cで1時間放置した。接種材料を除去した後、1%BSA、硫酸ゲンタマイシン50 µg/ml及びトリプシン5 µg/mlを含むDMEMを加えた。広範囲に細胞変性効果がみられるまで35°C、5%CO<sub>2</sub>下で2-3日間培養した。上清を回収してMDCK細胞で1代継代し、第1章第1節2)-(1)に準じてRNAを抽出した。

### (4) 逆転写反応及びウイルスゲノムの増幅

第1章第1節2)-(3)に準じて二本鎖cDNAを合成後、PCRを行った。

### (5) アガロースゲル電気泳動

第1章第1節2)-(4)に準じてアガロースゲル電気泳動を行った。

## (6) DNA断片の精製

第1章第1節 2)–(5)に準じてDNA断片を精製した。

## (7) 塩基配列の決定及び系統進化解析

第1章第1節 2)–(8)に準じてHA遺伝子のHA1領域及びNA遺伝子の塩基配列を決定した。塩基配列の決定にはTable 11に示すプライマーを使用した。系統樹は第1章第2節 2)–(6)に準じて作成した。プライマーの合成はファスマックに委託した。

**Table 11. Primers Used in this Chapter**

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Nucleotide position
HA gene		
H1 -F1	AAGTTCATGGCCCAA	411-425
H1 -F2	TTTATGAACTATTACTGGAC	730-746
H1 -F3	AAGAGCACACAGAATGCCA	1,147-1,165
H1 -R1	TTGGGCCATGAACTT	425-411
H1 -R2	TTTGTCCAGTAATAGTTCAT	746-730
H1 -R3	GGCATTCTGTGTGCTCTT	1,147-1,165
NA gene		
N1-F1	TAGCGGGCAATTCCTCTCT	254-272
N1-F2	AGAACAACAAGAGTCTGAATG	673-692
N1-F3	TTTTGAGATGATTTGGGAT	1,110-1,128
N1-R1	AGAGAGGAATTGCCCGCTA	272-254
N1-R2	CATTCAGACTCTTGTGTTCT	692-673
N1-R3	ATCCCAAATCATCTCAAAA	1,128-1,110

Nucleotide positions are numbered according to the HA gene of influenza A virus (Gene Bank; accession number GQ162202) and the NA gene of influenza A virus (Gene Bank; accession number GQ162201).

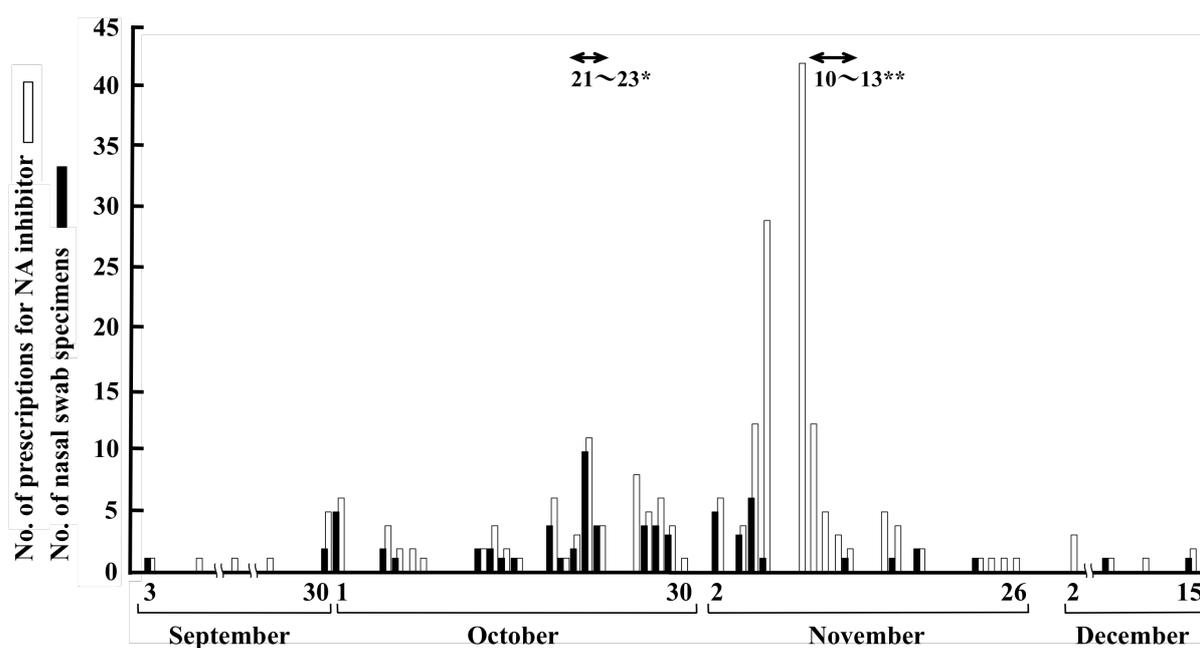
## (8) 統計解析

アミノ酸置換率の有意差検定はZ検定を用いて行い、 $p < 0.01$ をもって有意差ありとした。

### 3) 結果

#### (1) ウイルス分離

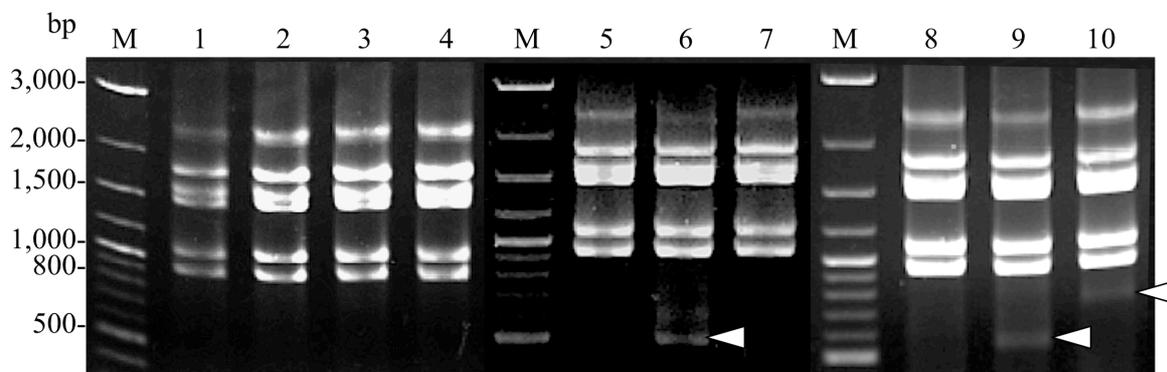
2009年度, 本学クリニックにおいてインフルエンザ簡易検査で陽性を示した患者は226名であった. このうち, 9月から12月の4ヶ月間に陽性が確認された患者は166名にのぼった. この期間の本学クリニックにおけるNA阻害剤(タミフル<sup>®</sup>またはリレンザ<sup>®</sup>)の処方数ならびにウイルス分離に供した検体数を Fig. 16 に示す. 処方数のピークは, 10月中旬から下旬にかけて, ならびに11月上旬から中旬にかけての2相に分かれた. 10月21~23日には本学看護福祉学部臨床福祉学科2年, 11月10~13日には薬学部2年の学年閉鎖措置が執られており, これらは処方数のピーク期間と一致した. 特に, 11月1~15日におけるNA阻害剤の処方数は, 調査期間の全処方数221件中の115件(52%)を占めた.



**Fig. 16. Number of Prescriptions of NA Inhibitors and Swab Samples During the Study Period**  
The numbers of prescription for oseltamivir or zanamivir and nasal swab specimens collected are shown. Classes were closed due to high absenteeism in the School of Nursing and Social Services (\*) and School of Pharmaceutical Sciences (\*\*).

期間中に採取した鼻腔スワブ 71 検体のうち、70 検体が MDCK 細胞に細胞変性効果を示した。これらの 70 株を採取日順に T1~T70 と名付け、それらの感染細胞培養上清から RNA を抽出して第 1 章で述べた A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法を用いて全 8 分節の増幅を試みた。その結果、T1~T70 全ての株においてポリメラーゼ遺伝子、HA, NP, NA, M 及び NS 遺伝子に相当する約 2.3kb, 1.8kb, 1.6kb, 1.5kb, 1.1kb 及び 0.9kb の DNA 断片が増幅された (Fig. 17)。したがって、いずれも A 型インフルエンザウイルスであることが確認された。さらに、T50 では約 0.5kb, T58 では 0.6kb, T59 では 0.8kb の断片が確認された。

増幅産物の HA 及び NA 遺伝子に相当する 1.8kb 及び 1.5kb の DNA 断片を切り出して精製し、FWUni12 及び RVUni13 を用いたダイレクトシーケンシングに供した。その結果、全ての塩基配列は A (H1N1) pdm09 の HA 遺伝子 (Accession No.: GQ165814) または NA 遺伝子 (Accession No.: GQ166204) の両端の塩基配列と 99%以上の相同性を示した。以上の成績から、2009 年 9 月から 12 月の間に本学クリニックで分離された A 型インフルエンザウイルス 70 株は、すべて A (H1N1) pdm09 であることが分かった。

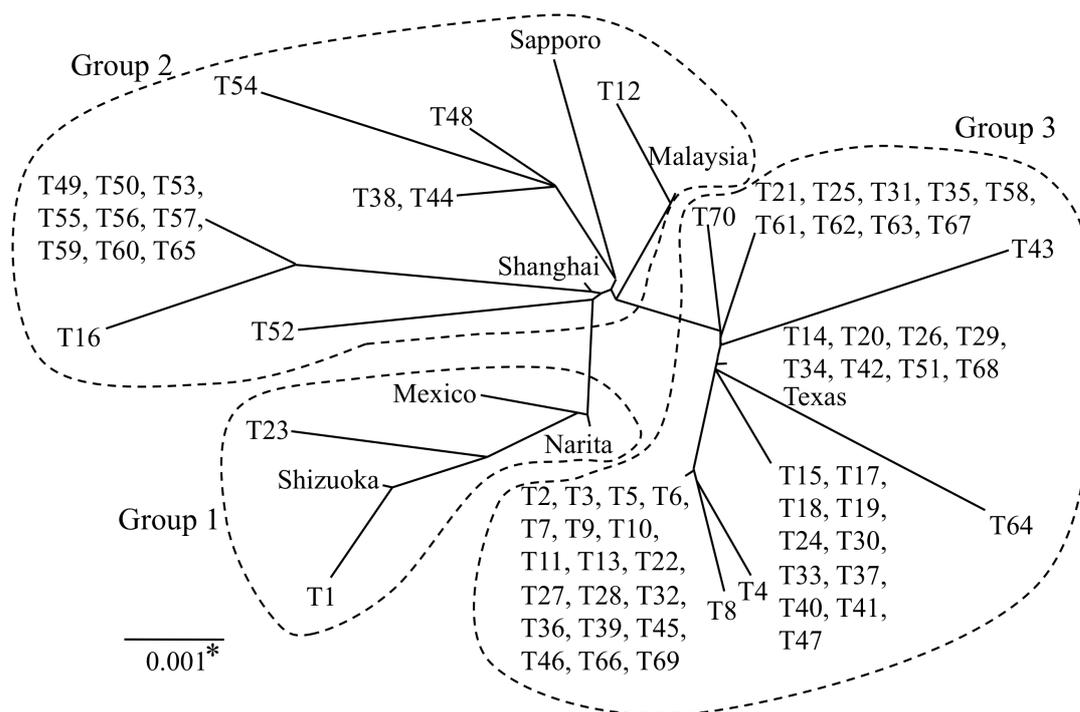


**Fig. 17. Amplification of A (H1N1) pdm09 Genomes**

Lane M, 2-Log DNA ladder, lanes 1 to 10, T1, T14, T15, T20, T47, T50, T60, T57, T58, T59. Arrowheads show the extra bands, which are smaller than the NS gene.

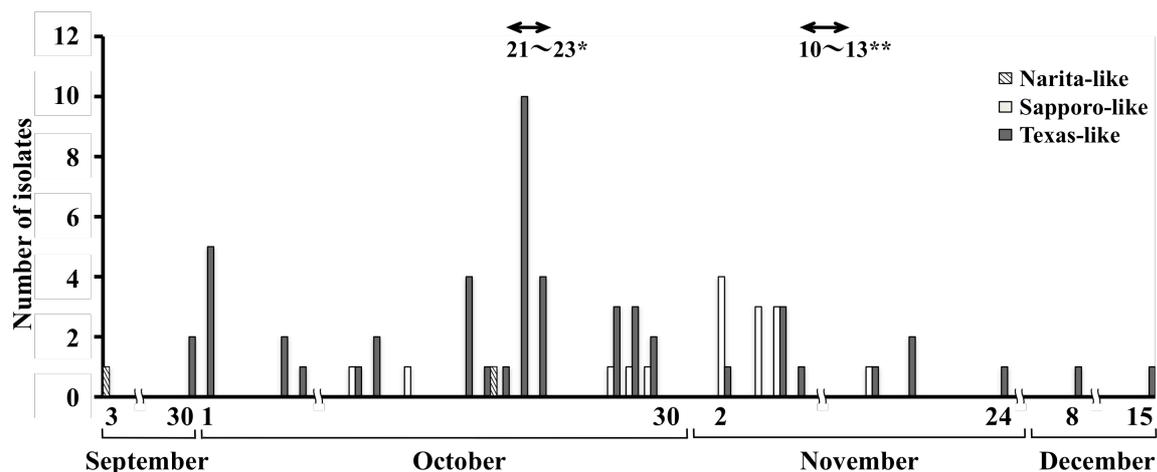
## (2) HA 遺伝子の系統進化解析

Table 11 に示すプライマーを用いて 70 株の HA 遺伝子の HA1 領域の塩基配列を決定し、系統進化解析を行った。その結果、70 株は大きく 3 つのグループ (Narita 株様, Sapporo 株様, Texas 株様) に分かれた (Fig. 18)。グループ 1 には 9 月 3 日に本学クリニックで最初に分離された T1 及び 10 月 21 日に分離された T23 の 2 株 (3%) が含まれた。これらは、4 月 7 日にメキシコで分離された A/Mexico/4115/2009 (H1N1) や、5 月 8 日に日本で最初に分離された A/Narita/1/2009 (H1N1) (Narita 株) と近縁であった。グループ 2 には 10 月 13 日～11 月 17 日に分離された 16 株 (23%) が含まれ、これらは 6 月 11 日に北海道で最初に分離された A/Sapporo/1/2009 (H1N1) (Sapporo 株) と近縁であった。グループ 3 には全体の 74% に相当する 52 株が含まれ、9 月 30 日～12 月 15 日と流行期全体に渡って分離された (Fig. 19)。これらは 6 月 10 日にアメリカで分離された A/Texas/42102708/2009 (H1N1) (Texas 株) や、6 月 20 日にオーストラリアで分離された A/Australia/15/2009 (H1N1) と近縁であった。



**Fig. 18. Phylogenetic Tree of the HA Gene of A (H1N1) pdm09**

The dotted lines show the three groups within the tree. Accession Nos. : Malaysia, CY048925; Mexico, GQ149647; Narita, GQ165815; Sapporo, GQ365446; Shanghai, GQ225357; Shizuoka, GU014802; Texas, CY052266. Nucleotide sequence data in this study have been deposited with the DNA Data Bank of Japan under Accession Nos. AB665960-665971. \*evolutionary distance.

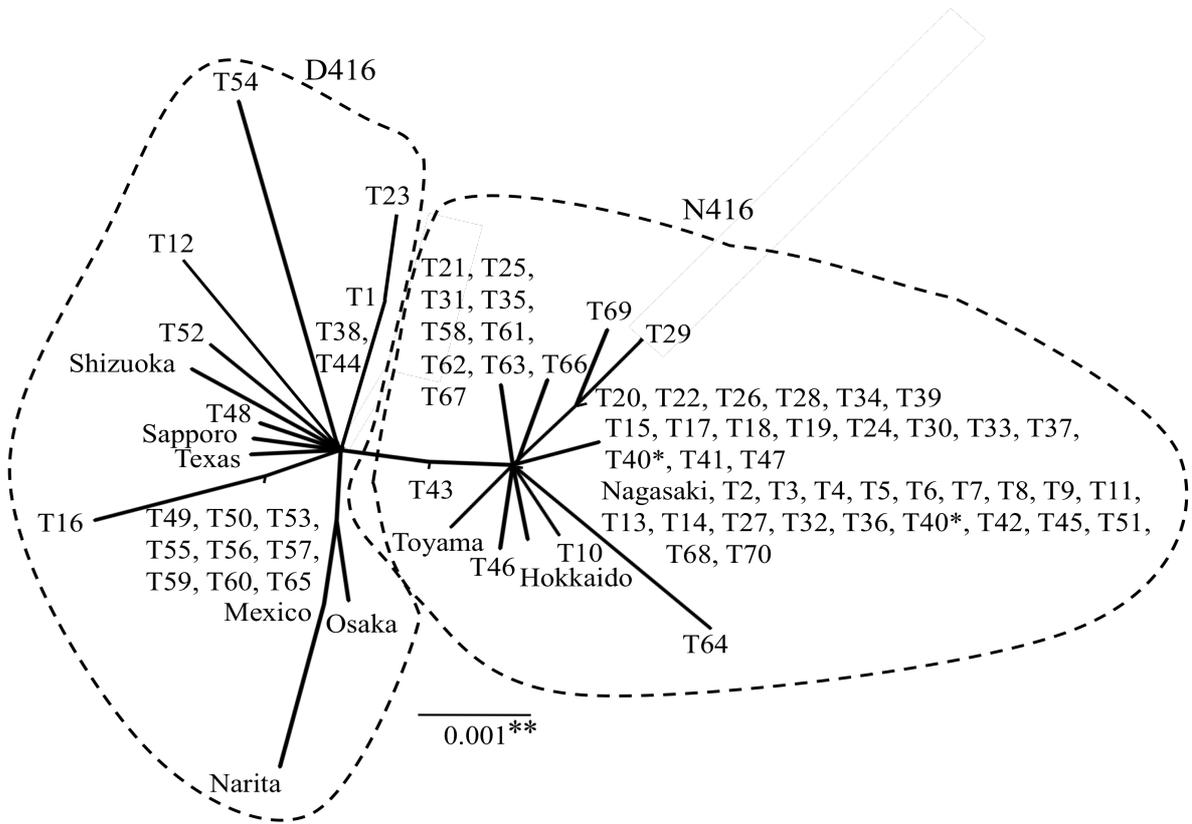


**Fig. 19. Timing of Virus Isolation**

Narita (hatched columns), Sapporo (open columns) and Texas (solid columns) like viruses are shown. Classes were closed due to high absenteeism in the School of Nursing and Social Services (\*) and School of Pharmaceutical Sciences (\*\*).

### (3) NA 遺伝子の系統進化解析

Table 11 に示すプライマーを用いて 70 株の NA 遺伝子塩基配列を決定し、系統進化解析を行った。その結果、調べた株は 416 番アミノ酸をコードする 1,246 番塩基の違いによって大きく 2 グループ (Nagasaki 株様, Sapporo 株様) に分けられた (Fig. 20)。HA 遺伝子で Narita 株様グループに含まれたウイルスは、NA 遺伝子では Sapporo 株様グループに含まれた。また、HA 遺伝子で Texas 株様ウイルスに含まれたウイルスはすべて、10 月 26 日に長崎で分離された A/Nagasaki/09N028/2009 (H1N1) (Nagasaki 株) と近縁であった。Nagasaki 株様ウイルスは流行期全体に渡って分離された。また、T40 は 624 番塩基が T/C のヘテロであった。



**Fig. 20. Phylogenetic Tree of the NA Gene of A (H1N1) pdm09**

The dotted lines show the two groups within the tree. Accession Nos. : Nagasaki, CY066154; Hokkaido, AB576884; Toyama, AB649898; Sapporo, GQ365448; Shizuoka, GU084013; Mexico, GQ149644; Osaka, GQ365445; Narita, GQ166205. \*The 624th base sequence of T40 was a mixture of T and C. \*\*evolutionary distance.

#### (4) HA1のアミノ酸変異

Narita株のHAを基準として、70株のHA1領域のアミノ酸配列を比較した。その結果、Narita株様グループのHAは、293番アミノ酸がグルタミンからヒスチジンに変異(Q293H)していた。さらに、T23にはR45G変異も認められた。Sapporo株様グループには全ての株にS203T変異が認められ、さらに、G39E, N64D, S69L, S84N, D86G, A134T, D187N, D274N, L314M及びV321Iのユニークな変異が10カ所で認められた。また、Texas株様グループにはS203T変異に加えてA197Tが認められ、さらに、K22R, D35N, D35E, N129D, P137L及びA186Tの6つのユニークな変異が認められた(Table 12)。

抗原変異の速度を推定するため、70株のA(H1N1)pdm09 HA1領域のアミノ酸置換率を調べた。季節性H3N2及びH1N1ウイルスの非同義置換/同義置換(dN/dS)の割合は1以下<sup>82)</sup>であったのに対し、調べた70株はいずれのグループにおいても1以上であった(Table 12)。したがって、A(H1N1)pdm09は季節性H3N2及びH1N1ウイルスに比べ強い選択圧を受けていることが示唆された。さらに、アミノ酸変異を生じる割合を全塩基置換中の非同義置換の割合[dN/(dN+dS)]で比較したところ、本学における流行期全期間を通じて分離されたTexas株様グループはSapporo株様グループに比べて有意に高い値を示した( $p=0.0002$ )。Texas株様グループのウイルスは抗原変異の速度が大きかった可能性がある。

**Table 12. Amino Acid Differences in HA and Non-synonymous/Synonymous Substitution Rate**

Virus	Amino acid position																				dN/dS (dN+dS)	dN/ (dN+dS)
	22	35	39	45	64	69	84	86	129	134	137	186	187	197	203	222	274	293	314	321		
Narita	K	D	G	R	N	S	S	D	N	A	P	A	D	A	S	D	D	Q	L	V	1/1	
T1																		H			2/1	
T23			G															H			3/2	0.600
Sapporo														T	E						3/0	
T12					L									T		N					5/1	
T16					N	G								T			M	I			4/2	
T38-like									T					T							2/1	
T48			E											T			M				27/18	
T49-like							G							T							3/1	
T52				D								N		T							1/4	
T54														T							45/27	0.625
Texas														T							38/19	
T2-like														T							2/2	
T4														T							3/1	
T8										L				T							16/0	
T14-like														T							33/0	
T15-like	R													T							27/0	
T21-like												T		T							3/0	
T43			N											T							3/1	
T64			E											T							3/0	
T70								D						T							128/23	0.848

$p=0.0002$

T2-like n=19, T14-like n=8, T15-like n=11, T21-like n=9, T38-like n=2, T49-like n=9. dN/dS is the ratio of nonsynonymous vs. synonymous substitutions.

## (5) NA のアミノ酸変異

Sapporo 株の NA を基準として 70 株の NA のアミノ酸配列を比較したところ、Sapporo 株様グループの NA はすべて 416 番アミノ酸がアスパラギン酸 (D) であった。一方、Nagasaki 株様グループはすべてアスパラギン (N) であった (Table 13)。また、Nagasaki 株様グループには A75D, P154S, D199N, S247N, N385D, I389T の 6 つのユニークな変異が認められた。一方、Sapporo 株様グループには、I38V, G41E, S82P, I106V/L, V357I, W380S の 6 つのユニークな変異が認められた。オセルタミビル耐性マーカーである H275Y 変異は、いずれの株でも認められなかった。また、アミノ酸の欠損を示す株は確認されなかった。

70 株の NA のアミノ酸置換率を調べたところ、dN/dS は Sapporo 株様グループではほぼ 1 以下だったのに対し、Nagasaki 株様グループでは 1 以上の株が多かった。dN/(dN+dS) を比較したところ、Nagasaki 株様グループは Sapporo 株様グループに比べて有意に高い値を示した ( $p=0.0049$ )。

**Table 13. Amino Acid Differences in NA and Non-synonymous/Synonymous Substitution Rate**

Virus	Amino acid position																			dN/dS (dN+dS)
	38	41	75	82	106	154	199	247	248	275	343	357	380	385	389	416	450	450		
Sapporo	I	G	A	S	I	P	D	S	D	H	A	V	W	N	I	D	S			
Narita					V			N												
T1			P															1/1		
T23			P															1/1		
T12	V	E										S						3/0		
T16					L													1/2		
T38-like																		0/0		
T48																		0/1		
T49-like																		0/9		
T54										I								1/3		
																		7/19		
																		0.270		
Nagasaki																				
T2-like																N		21/21		
T15-like																N		11/22		
T46																N		1/2		
T10						S									N			2/1		
T20-like															T	N		12/6		
T69															T	N		2/2		
T21-like																D		18/9		
T29								N							T	N		3/1		
T64										N						N		2/3		
T66			D													N		2/1		
																		65/48		
																		0.575		

$p=0.0049$

T2-like n=21, T15-like n=11, T20-like n=6, T21-like n=9, T38-like n=3, T49-like n=9. dN/dS is the ratio of nonsynonymous vs. synonymous substitutions.

#### 4) 考察

2009年9月から12月に本学クリニックで分離されたインフルエンザウイルス70株は、すべてA(H1N1)pdm09であった。HA 遺伝子の系統進化解析ならびにアミノ酸配列の比較結果から、今回調べた70株は大きく3つのグループ(Narita株様, Sapporo株様, Texas株様)に分けられた。Texas株様グループのウイルスは調査期間中を通して分離され、特に、54株中20株(37%)が10月19~23日の間に分離された(Fig. 18)。このことから、Texas株様グループのウイルスが看護福祉学部における1度目の学年閉鎖の起因ウイルスであると考えられた。Sapporo株様グループのウイルスは、主に10月下旬から11月上旬に分離された。したがって、2度目の学年閉鎖はこのウイルスによるもので、薬学部での流行の原因と考えられた。薬学部の学年閉鎖時期にはNA阻害剤の処方数が著しく増大していた。その処方数から推定すると、Sapporo株様グループのウイルスが調査期間中におけるA型インフルエンザ陽性全患者の半数程度を占めると考えられる。Blastで検索した結果、Sapporo株様のウイルスは国内外の他地域でも多数分離されていることが分かった。

Nelsonら<sup>7)</sup>はA(H1N1)pdm09の全ゲノム系統進化解析を行い、今回のパンデミックウイルスはクレード1~7に分類されることを報告した。Narita株のHA遺伝子に認められたQ293H変異はクレード6のHA遺伝子にのみ確認されていることから、Narita株様グループはクレード6に属すると考えられた。一方、Sapporo株及びTexas株様グループに認められたS203T変異はクレード7のHA遺伝子にのみ確認されていることから、これらのウイルスはクレード7に属すると考えられた。S203T変異は、1918年に流行したH1N1スペインかぜやA(H1N1)pdm09の流行初期に分離された株では確認されていない。さらに、Texas株様グループではS203T変異に加えてA197T変異が確認された。2009年6月から2010年3月に長崎で分離された75株のうち、A197TとS203Tの両変異を持つウイルスはわずか6株(8%)であった。<sup>83)</sup>2009年5月から2010年1月に日本各地で分離された253株においても、両変異を持つウイルスは20%未満であった。<sup>81)</sup>さらに、S203T変異を持つ563株のA(H1N1)pdm09をBlast検索に供したところ、A197T変異を持つウイルスは123株(22%)であった。これらのことから、Texas株様グループのウイルスは国内外の他の地域では少数派であったことが示唆された。このようなTexas株様グループウイルスの感染拡大が看護福祉学部におけるパンデミックの特徴と考えられる。

HAの69, 137, 186及び187番アミノ酸は、それぞれ抗原決定基Cb, Ca, Sb及びSb

に位置する。<sup>84)</sup> このことから、Sapporo 株及び Texas 株様グループのウイルスに認められたユニークなアミノ酸変異のうち、S69L, P137L, A186T 及び D187N 変異は HA の抗原性に影響を与える可能性がある。Texas 株様グループのウイルスの HA は、Sapporo 株様グループのウイルスと比較して非同義置換の割合が有意に高かった。そのために免疫選択圧を免れ、長期間に渡ってウイルスが流行したと考えられた。一方、Sapporo 株様グループのウイルスは変異速度が小さかったために一過性の流行で終息したのかもしれない。A (H1N1) pdm09 のアミノ酸置換率は、これまでの季節性 H3N2 ウイルスや H1N1 ウイルスと比べて非常に大きいことが報告されている。<sup>74)</sup> 季節性 H3N2 及び H1N1 ウイルスの非同義置換/同義置換 (dN/dS) の割合は 1 以下<sup>82)</sup> であるのに対し、調べた 70 株はいずれの系統においても 1 以上であった。したがって、A (H1N1) pdm09 はこれまでの季節性インフルエンザウイルスよりも強い免疫選択圧を受けていると考えられる。スペインかぜの原因ウイルスに対する抗体は A (H1N1) pdm09 と交差性を示すことが報告されている。1918 年以前に生まれた高齢者の多くは A (H1N1) pdm09 と反応する抗体を持っているため、<sup>76)</sup> 高齢者の患者は少なかった。しかしながら、アミノ酸置換率の大きい A (H1N1) pdm09 は、速やかに高齢者にも容易に感染する変異株が出現する恐れがある。そのため、今後も広範なウイルスの監視を継続する必要がある。

H1 亜型 HA の 203 番アミノ酸は赤血球凝集阻止抗体が認識する抗原決定基 Ca に位置する。<sup>84)</sup> したがって、Sapporo 株及び Texas 株様グループに認められた S203T 変異はウイルスの受容体結合活性に影響を及ぼすかもしれない。203 番アミノ酸に加えて一部の Sapporo 株様ウイルスで変異が認められた 134 及び 187 番アミノ酸も受容体結合領域に位置している。したがって、これらの変異もウイルスの宿主細胞への結合に影響を与える可能性がある。一方、D187E 及び D222G 変異は SA  $\alpha$  2-6Gal への親和性から SA  $\alpha$  2-3Gal 親和性へと変化させることが知られている。<sup>85)</sup> さらに、D222G/N 変異はウイルスの病原性を増強することが示唆されている。<sup>86)</sup> 本学で分離されたウイルス株ではこのような変異は認められなかった。

NA 遺伝子の系統進化解析を行ったところ、HA 遺伝子で Narita 株様グループに含まれた 2 株は NA 遺伝子では Sapporo 株様グループに含まれた。Nelson らが分類したクレード 5, 6 及び 7 の NA 遺伝子には、Sapporo 株の NA で検出された V106I 及び N248D 変異が認められている。<sup>77)</sup> さらに、今回調べた 70 株の NA 遺伝子は 416 番アミノ酸の変異で大きく 2 つのグループに分けられた。NA の非同義置換の割合は HA と比較して低かつ

たものの、Nagasaki 株様グループのウイルスの非同義置換の割合は Sapporo 株様グループのウイルスと比較して有意に高かった。調査期間を通して分離された 1 度目の学年閉鎖の原因と考えられるウイルスは、HA が Texas 株様グループで NA が Nagasaki 株様グループのウイルスであった。一方、薬学部で流行したと考えられるウイルスは、HA が Sapporo 株様グループで NA も Sapporo 株様グループのウイルスであった。NA 遺伝子の系統と HA 遺伝子の系統の間で交差が認められなかったことから、本学の流行では異なるグループ間での遺伝子再集合は生じなかったものと考えられた。

分離株を全ゲノム増幅法に供したところ、NS 遺伝子に相当する DNA 断片よりも短い断片が複数の株で確認された。これらの株には DI 粒子が含まれていたのかもしれない。DI-RNA 分節は自然界において子孫ウイルスに受け継がれる。<sup>41)</sup> したがって、同じ DI-RNA を有するウイルスが検出された患者は、同一の株に感染していた可能性がある。

いずれの株の NA においても、オセルタミビルに耐性を示す H275Y 変異は認められなかった。しかしながら、T29 には S247N 変異が認められた。この変異と H275Y 変異の両方を持つウイルスは、オセルタミビルに対する耐性が非常に強くなるだけでなく、ザナミビルに対しても低感受性を示すことが報告されている。<sup>87)</sup> さらに、これらの変異を持つウイルスはモルモット間における伝播力が増すことが分かっている。<sup>88)</sup> これらのことは、T29 が H275Y 変異を獲得した場合には、オセルタミビル及びザナミビルに耐性かつ感染性の強いウイルスになる可能性があることを示しており、今後も監視が必要である。

## 第2節 NA に欠損を有する新型 H1N1 インフルエンザウイルスの性状解析

### 1) 緒言

インフルエンザウイルスの NA は、ウイルスエンベロープ上のスパイク糖タンパク質に付加されたシアル酸を除去してウイルス粒子の凝集を防ぎ、また、出芽の際には宿主細胞の受容体を破壊してウイルス粒子の放出を助ける。<sup>5)</sup> 今日、インフルエンザの治療薬として主に用いられているザナミビル、リン酸オセルタミビル、ラニナビル、ペラミビルはいずれも NA 阻害剤である。これらは NA の受容体破壊活性を阻害することによってウイルス粒子の放出を妨げ、未感染細胞への感染、伝播を防ぐ。

2007 年以降、オセルタミビル耐性の季節性 H1N1 ウイルス株が世界各地で検出されるようになった。2008/2009 年のインフルエンザシーズンでは、日本を含め各国の耐性株の検出頻度は 90%以上であった。<sup>79,80)</sup> これまでのところ、2009 年に発生した A (H1N1) pdm09 の大部分は NA 阻害剤に対して感受性を示しているが、散発的に NA に特徴的なアミノ酸置換 (H275Y) を有するオセルタミビル耐性株が検出されている。<sup>81)</sup> また、NA 阻害剤への耐性には、NA の H275Y 変異の他に I233R, S247N 変異などが関与する。<sup>89)</sup> 本学で分離された 70 株の A (H1N1) pdm09 に H275Y 変異は認められなかったが、1 株に S247N 変異が認められた。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の出現を迅速に把握することは重要である。

2013 年に中国と台湾でヒトに感染した H7N9 鳥インフルエンザウイルスは、NA の軸領域の一部が欠損していた。<sup>67)</sup> この欠損によって HA と受容体の結合を切断する活性が相対的に低下し、ヒトでの増殖を可能にしたものと考えられる。また、NA の軸領域に欠損を有する H5N1-HPAI ウイルスでは、マウスに対する病原性が高くなることが報告されている。<sup>53)</sup> このように、HA と NA の活性バランスはインフルエンザウイルスの宿主域、増殖能及び病原性に大きな影響を与える。

本節では、本学で分離された 70 株の A (H1N1) pdm09 の薬剤耐性を解析するため、NA 阻害剤に対する感受性について検討した。さらに、薬剤に対して低感受性を示した株をプラーク純化し、各々の純化株の遺伝子解析を行うとともに MDCK 細胞での増殖能を調べ、性状解析を試みた。

## 2) 材料及び方法

### (1) 細胞

第2章2)-(1)に示した細胞を用いた.

### (2) ウイルス

第2章第1節で分離した70株のA(H1N1)pdm09(T1~T70)を用いた. オセルタミビル感受性標準株としてA/Denmark/524/2009(H1N1)(Den/524), 耐性標準株としてはA/Denmark/527/2009(H1N1)(Den/H275Y)を用いた. これらはMDCK細胞で増殖させた. Den/524及びDen/H275Yは, 国立感染症研究所の小田切孝人博士より分与を受けた.

### (3) プラーク形成試験

第1章第2節2)-(7)に準じ, トリプシン存在下でプラーク形成試験を行った. ただし, プラークの観察にはアガロースに代えて1%Avicel RC-591(FMC Biopolymer)を含むDMEMを重層した. 35°C, 5%CO<sub>2</sub>下で2日間培養後, クリスタルバイオレットで染色してプラークを観察した.

### (4) 逆転写反応及びウイルスゲノムの増幅

第1章第1節2)-(3)に準じて二本鎖cDNAを合成後, PCRを行った.

### (5) アガロースゲル電気泳動

第1章第1節2)-(4)に準じてアガロースゲル電気泳動を行った.

### (6) DNA断片の精製

第1章第1節2)-(5)に準じてDNA断片を精製した.

### (7) 塩基配列の決定

第1章第1節2)-(8)に準じてプラーク純化した株のHA及びNA遺伝子の塩基配列を決定した. 塩基配列の決定にはTable 11に示すプライマーを使用した.

## (8) NA 活性の測定

96 穴黒色マイクロタイタープレート (Costar) に 7 mM CaCl<sub>2</sub> を含む生理食塩水で希釈したウイルス液 10  $\mu$ l, 200 mM 酢酸ナトリウム溶液 40  $\mu$ l 及び基質として 0.5 mM 4-メチルウンベリフェリル-N-アセチル $\alpha$ -D-ノイラミン酸アンモニウム (4-MU-Neu5Ac) (ナカライテスク) 10  $\mu$ l を加えて 37°C で 1 時間保温した. 反応後, 1M グリシン-NaOH 溶液を 100  $\mu$ l 加え, 遊離した 4-メチルウンベリフェロンを励起波長 360 nm, 蛍光波長 440 nm で測定した. 測定にはマイクロタイタープレートリーダー (TECAN) を用いた. 阻害試験では, ウイルス希釈液 10  $\mu$ l とカルボン酸オセルタミビルまたはペラミビル (塩野義製薬) 10  $\mu$ l を混合して 37°C に 30 分静置し, 同様の基質を用いて NA の活性を調べた. カルボン酸オセルタミビルはロシユより分与を受けた.

## (9) 赤血球遊出試験

第 1 章第 2 節 2) - (2) に準じて赤血球凝集試験を行った. その後, 各穴に終濃度が 100 nM になるようにペラミビルを加え, 37°C に移して 1 時間ごとに赤血球凝集価 (HA 価) の変化を調べた.

## (10) ウイルス増殖能の評価

MDCK 細胞に感染多重性 (multiplicity of infection: MOI) 約 6 plaque forming unit (PFU) /cell となるようにウイルスを接種し, 35°C で 1 時間吸着させた. 接種液を除去して PBS で細胞を洗浄後, 硫酸ゲンタマイシン 50  $\mu$ g/ml 及びトリプシン 5  $\mu$ g/ml を含む DMEM を加えて 35°C で培養した. 4 時間ごとに上清を回収し, 感染価をプラーク形成試験によって調べた. また, 感染 32 時間後に *Clostridium perfringens* 由来シアリダーゼ (New England Biolabs) を終濃度が 30 mU/ml になるように添加し, 上清のウイルス感染価を継時的に調べた.

### 3) 結果

#### (1) 本学クリニックで分離された新型 H1N1 インフルエンザウイルスのオセルタミビルに対する感受性

本学で分離された 70 株の A(H1N1)pdm09 について、蛍光基質 4-MU-Neu5Ac を用いてカルボン酸オセルタミビルによる NA 活性の阻害効果を測定した。成績の一部を Fig. 21 に示す。T29 及び T64 を除くすべての株が 50 nM オセルタミビルで 50%以上の阻害を受けた。それらに対するオセルタミビルの 50%抑制濃度 (50% inhibitory concentration:  $IC_{50}$ ) は 8.1-39.5 nM であった。また、Den/524 に対する  $IC_{50}$  は 34.7 nM であった。一方、T29 及び T64 に対する 50 nM オセルタミビルの阻害率は 40%と他に比べて低く、これら 2 株のカルボン酸オセルタミビルに対する感受性は低い傾向にあった。また、50 nM におけるオセルタミビル耐性標準株である Den/H275Y に対する阻害率は 6%であった。

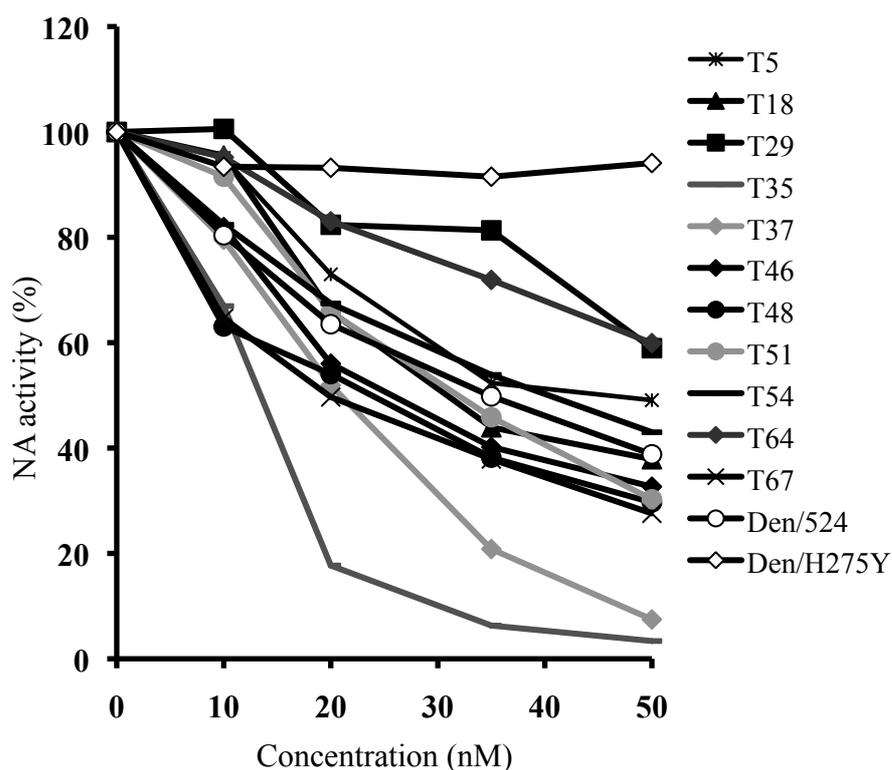
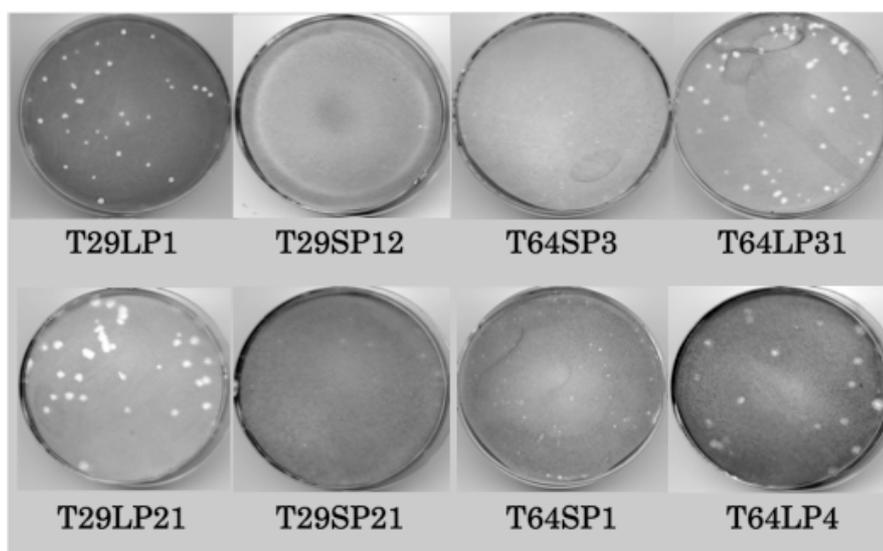


Fig. 21. NA Inhibition Assay by Oseltamivir

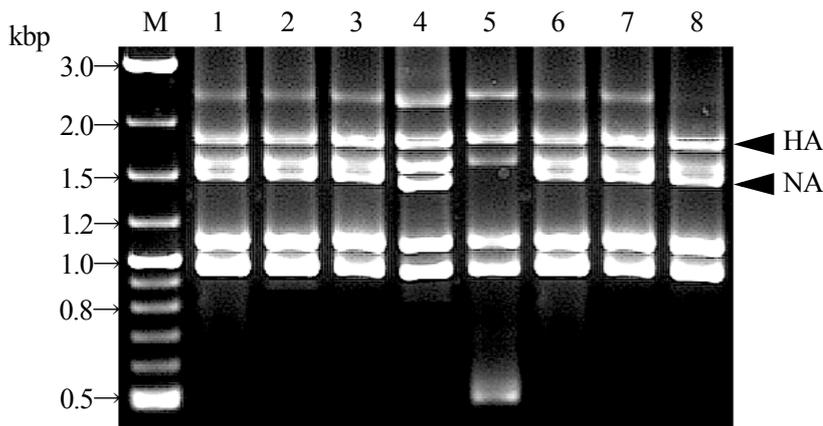
## (2) NA 遺伝子欠損株の検出

プラーク形成試験の結果、いずれの分離ウイルスも大小様々なプラークを形成した。したがって、1つの分離株には MDCK 細胞における増殖能が異なるウイルスが混在していると考えられた。そこで、オセルタミビルに対して低感受性を示した T29 及び T64 についてプラーク純化を行い、各々4株ずつのプラークサイズが異なるクローンを得た。T29LP1, T29LP21, T64LP4, T64LP31 は MDCK 細胞において大きなプラークを、T29SP12, T29SP21, T64SP1, T64SP3 は針穴程度のプラークを形成した (Fig. 22).

これらの純化株感染細胞の培養上清から RNA を抽出し、第1章で述べた A 型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法に供した。その結果、T29 由来 4 クローンならびに T64SP1, T64SP3 及び T64LP31 では約 2.3kb, 1.8kb, 1.6kb, 1.5kb, 1.1kb 及び 0.9kb の DNA 断片が増幅された。一方、T64LP4 では約 2.3kb, 1.8kb, 1.6kb, 1.1kb, 0.9kb 及び 0.5kb の断片が増幅された (Fig. 23).



**Fig. 22. Plaque Morphology of the Mutant Strains Derived from T29 and T64 on MDCK Cells**



**Fig. 23. Amplification of the Genome of the Mutant Strains Derived from T29 and T64**

Lane M, 2-Log DNA ladder, lanes 1 to 8, T29LP1, T29LP21, T29SP12, T29SP21, T64LP4, T64LP31, T64SP1, T64SP3. Arrowheads indicate the bands, corresponding to HA and NA genes, respectively.

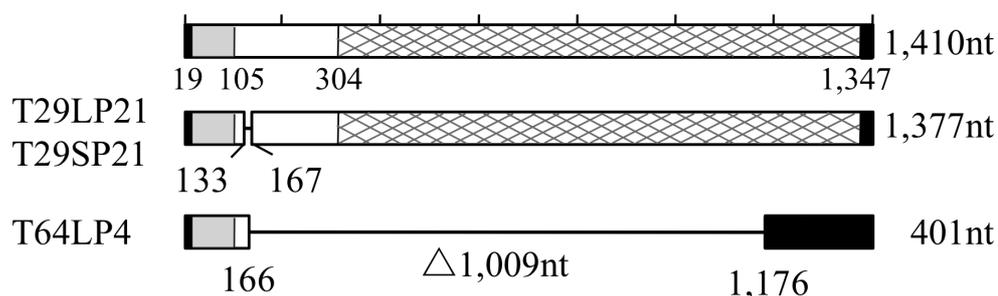
T29 のプラーク純化株の HA 及び NA 遺伝子に相当する 1.8kb 及び 1.5kb 断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を比較した。その結果、T29 の純化株の NA にはすべて S247N 変異が認められた。さらに、T29SP21 及び T29LP21 は NA の軸領域に 134-166 番の 33 塩基すなわち 11 アミノ酸の欠損が認められた。また、T29SP21 及び T29LP21 の NA に変異は認められなかったが、HA に K130N 変異が認められた (Table 14)。

**Table 14. Amino Acid Differences of HA and NA of the Mutant Strains Derived from T29**

Virus	Amino acid position of HA		Amino acid position of NA													
	124	130	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	247	343
T29	N	K	Q	I	E	T	C	N	Q	S	V	I	T	Y	N	A
T29LP1	D															
T29SP12																T
T29LP21		N	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T29SP21			H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Only amino acid changed from parent T29 virus is indicated. The - indicates deletion of amino acid.

T64LP4 ゲノム増幅産物中の約 0.5kb 断片を切り出して精製し、塩基配列を決定した。その結果、T64 の NA 遺伝子の 1-166 及び 1,176-1,410 番塩基と一致した。すなわち、本断片が NA 遺伝子に由来するものであり、その 167-1,175 番塩基を欠損したものであることが分かった (Fig. 24)。産物ではフレームシフトにより NA の 56 番及び 57 番アミノ酸が変異し、58 番目に終止コドンが確認された。T64LP4 を除く T64 の純化株には NA 阻害剤に抵抗性の変異は認められなかった。T64LP4 の HA では K153E 及び M257I 変異が認められた (Table 15)。



**Fig. 24. Schematic Representation of NA Genes of T29LP21, T29SP21 and the 0.5 kb-Fragment Product of T64LP4**

Trans-membrane, stalk, enzymatic domain, and noncoding region are indicated by gray, white, hatched and solid boxes, respectively.

**Table 15. Amino Acid Differences of HA and NA of the Mutant Strains Derived from T64**

Virus	Amino acid position of HA				Amino acid position of NA			
	35	153	212	257	56	57	58	177
T64	E	K	P	M	Y	E	N	V
T64SP1			Q					
T64SP3								I
T64LP31								I
T64LP4		E		I	L	S	Amber	-

Only amino acid changed from parent T64 virus is indicated. The - indicates deletion of amino acid. Amber indicates stop codon: UAG.

### (3) プラーク純化株と親株の NA 阻害剤に対する感受性の比較

NA の軸領域に 11 アミノ酸の欠損を有する T29LP21, T29SP21 及び NA の酵素活性領域を完全に欠失する T64LP4 に対するペラミビルの NA 阻害活性を調べた。T29LP21 及び T29SP21 に対する  $IC_{50}$  は各々 0.35 nM 及び 0.31 nM で、親株である T29 の  $IC_{50}$  0.42 nM または Den/524 に対する  $IC_{50}$  0.22 nM とほぼ同等であった (Fig. 25)。T64LP4 では、阻害試験に十分な酵素活性は認められなかった。オセルタミビル耐性の Den/H275Y は、ペラミビル 100 nM 存在下においても 80%以上の NA 活性を示した。

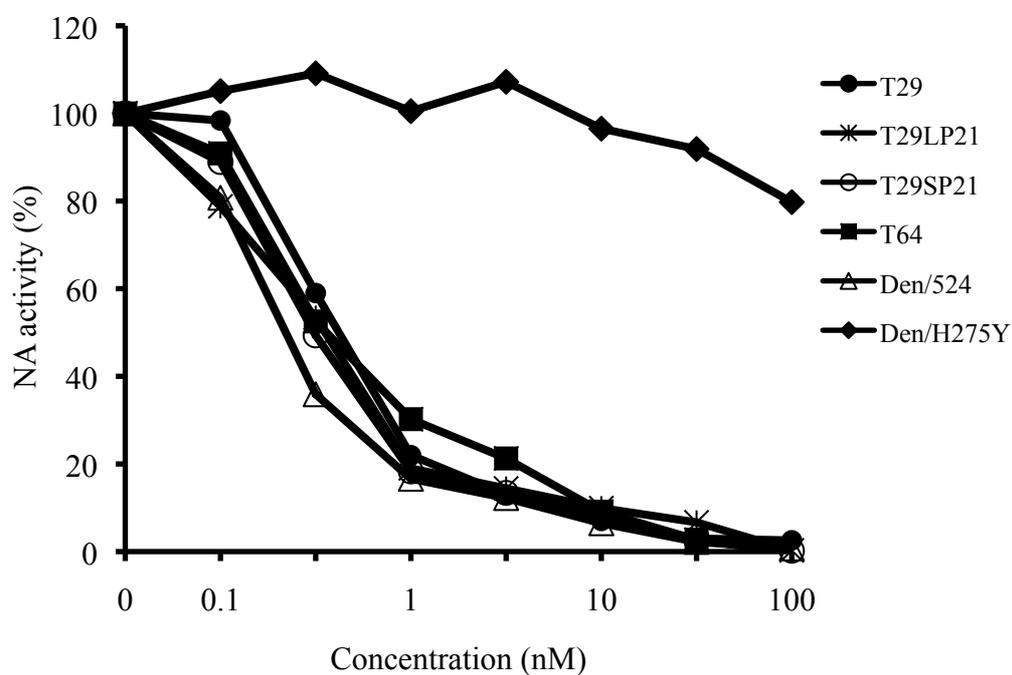
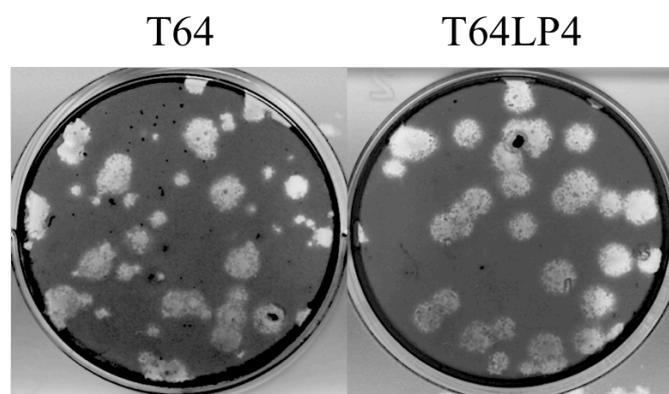


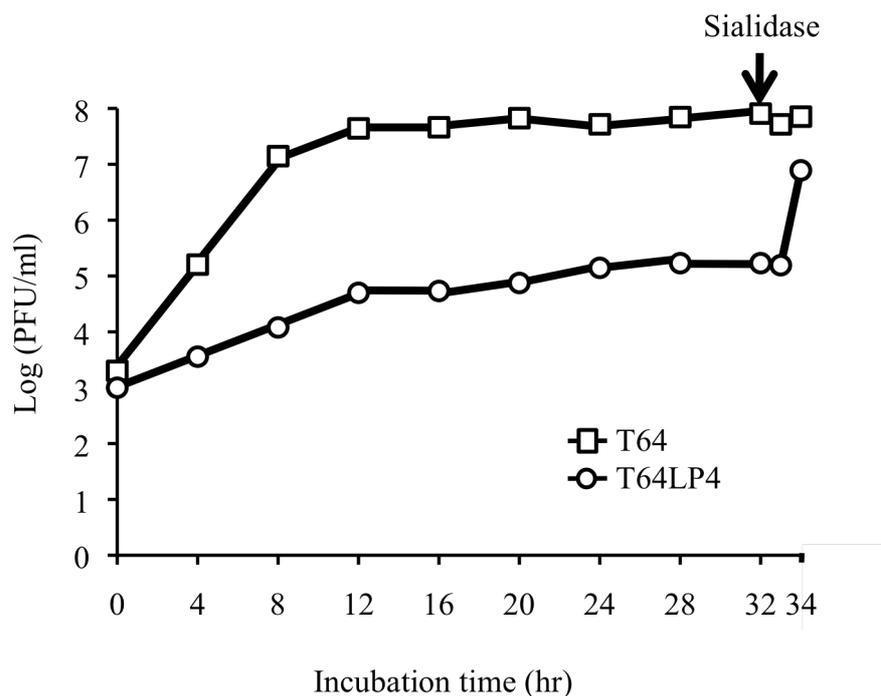
Fig. 25. Inhibition of NA Activity by Peramivir

#### (4) NA 欠損クローンの MDCK 細胞における増殖

T64LP4 は NA 活性ドメインを完全に欠損しているにもかかわらず、プラーク形成試験において大きなプラークを形成した (Fig. 26). 一般的な NA 阻害剤耐性株は NA 活性が低いいためウイルス放出効率が悪く、小さなプラークを形成する傾向がある。そこで、T64 と T64LP4 の MDCK 細胞における増殖能を一段階増殖試験によって比較検討した。その結果、T64LP4 の増殖速度は T64 に比べて遅いことが分かった。すなわち、T64 感染細胞の上清中のウイルス量は感染 12 時間後にほぼプラトーに達したのに対し、T64LP4 では 28 時間まで増加し続けたが、感染 32 時間後のウイルス量は T64 の約 1/1,000 にとどまった。その後、細菌由来のシアリダーゼを培養液に添加したところ、T64LP4 感染細胞培養上清中のウイルス量は添加後 2 時間で約 40 倍に増加した。一方、完全な NA スパイク糖タンパク質を有する T64 では、上清中のウイルス量の増加は認められなかった。この成績は、シアリダーゼ処理によって宿主細胞表面のシアル酸に捕捉されていた T64LP4 の粒子が遊離したことを示すものと考えられる (Fig. 27)。プラーク形成試験の結果から、T64LP4 のウイルス粒子の産生は、親株と同等以上であったと考えられた。



**Fig. 26. Plaque Morphology of Parent Strain T64 and Mutant Strain T64LP4**

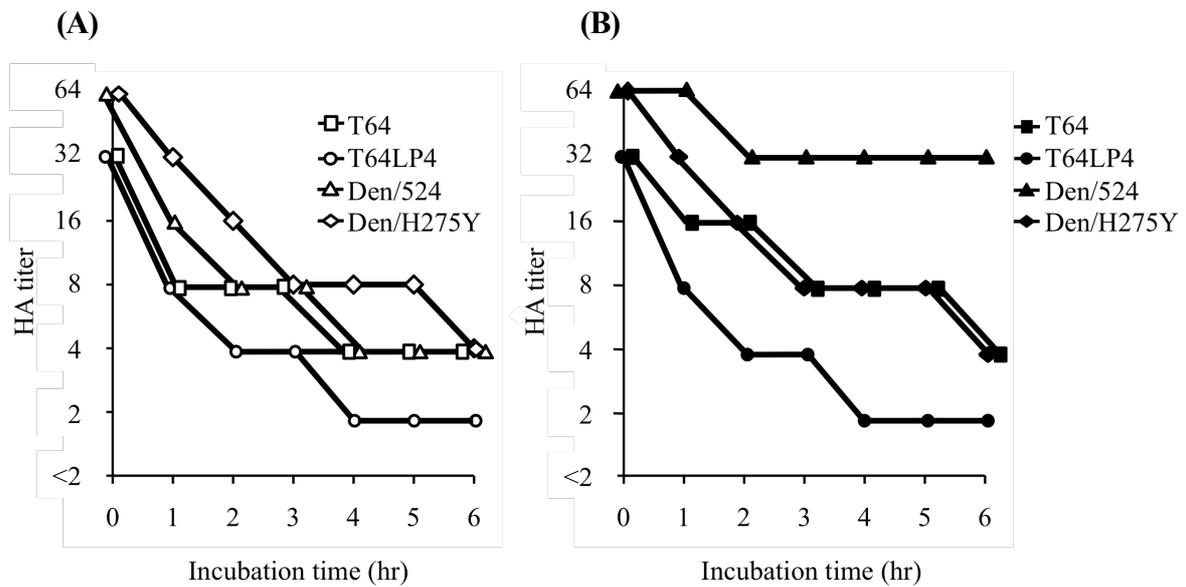


**Fig. 27. One-step Growth of T64 and T64LP4 on MDCK Cells**

At 32 hr post-infection *C. perfringens* sialidase was added.

#### (5) NA 欠損クローンのニワトリ赤血球からの遊出

T64LP4 は NA 活性を有しないにもかかわらず、感染細胞培養上清中に放出された。そこで、ニワトリ赤血球を用いて T64LP4 の HA と受容体との相互作用を調べた。T64LP4 は氷温下で赤血球凝集活性を示した (32HA)。これを 37°C に移したところ、NA 活性を欠くにもかかわらず親株である T64 及び Den/524, Den/H275Y と同様に T64LP4 の HA 価は低下した (Fig. 28A)。したがって、T64LP4 はニワトリ赤血球上の受容体を破壊することなしに赤血球から遊出するものと考えられた。次いで、NA 阻害剤であるペラミビル存在下で同様の試験を行った。感受性標準株である Den/524 では、HA 価の低下は 1/2 にとどまったのに対し、オセルタミビルに対して低感受性を示した T64 では、ペラミビル非存在下と同様に HA 価は 1/8 まで低下し、T64LP4 及び耐性標準株である Den/H275Y では HA 価は 1/16 まで低下した (Fig. 28B)。この成績から、ペラミビルは T64 及び T64LP4 の増殖を阻害しない可能性が示された。

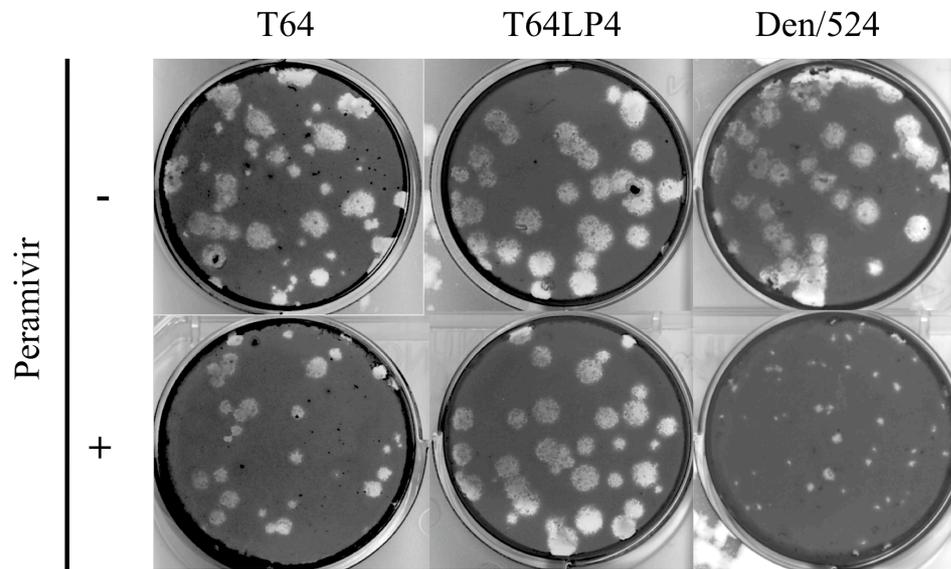


**Fig. 28. Virus Elution Assay Using Chicken Erythrocytes for the Parent and Mutant Strains T64**

Open and solid symbols indicate virus alone and with peramivir, respectively.

#### (6) NA 欠損クローンのペラミビル存在下における増殖

NA を完全に欠損する T64LP4 の増殖に対するペラミビルの影響をプラーク形成試験によって検討した。その結果、T64LP4 ではペラミビル 1  $\mu$ M 存在下でも非存在下と同等のプラークを形成したのに対し、親株である T64 及び Den/524 ではペラミビルによってプラークの数及び大きさが減少した (Fig. 29)。このことから、T64LP4 はペラミビルによって増殖抑制を受けない耐性株であることが確認された。また、T64 ではペラミビル存在下においても一部大きなプラークが形成されたことから、本薬剤に対しても低感受性を示すことが確認された。



**Fig. 29. Plaque Morphology of T64, T64LP4, and Den/524 on MDCK Cells**

Cells infected with each virus were incubated in the absence (-) or presence (+) of 1  $\mu$ M peramivir.

#### 4) 考察

2009年9月から12月に本学クリニックで分離された70株のA(H1N1)pdm09の中で、T29及びT64の2株がオセルタミビルに対して低感受性を示した。NA阻害剤への耐性には、NAのH275Y変異の他にI233R, S247N変異などが関与する。<sup>89)</sup> T29のNAはS247N変異を有していたことから、本ウイルスはオセルタミビルに対して低感受性を示したものと考えられる。S247N変異を有するウイルスは、2010年12月からオーストラリアやシンガポールでしばしば検出されている。<sup>87)</sup> また、H275YとS247Nの両変異を有するA(H1N1)pdm09は、モルモット間の空気感染による伝播性が増すことが報告されている。<sup>88)</sup> したがって、効果的な抗インフルエンザ化学療法を実施するためにはT29様ウイルスに対する監視を継続し、H275Y変異の獲得を早期に発見する必要がある。一方、T29のプラーク純化株2株(T29LP21, T29SP21)は、NAの軸領域に11アミノ酸の欠損を有していた。これらのペラミビルに対する感受性は親株であるT29と同程度であった。したがって、軸領域の欠損はNA阻害剤感受性には影響しないものと考えられた。H5N1-HPAIウイルスにおいて、NAの軸領域の欠損はマウスに対する病原性の増強に関与することが報告されている。<sup>53)</sup> 今後、T29LP21及びT29SP21と親株のマウスに対する病原性を比較する必要がある。また、T29LP1及びT29LP21は大きなプラークを形成し、T29SP12及びT29SP21は針穴大のプラークを形成した。T29LP1とT29SP12では、HAの124番、NAの343番アミノ酸が異なっていた。一方、T29LP21とT29SP21では、NAに変異は認められなかったが、HAの130番アミノ酸が異なっていた。これらの変異がHAとNAの活性バランスに影響を与え、MDCK細胞における増殖能に影響を及ぼした可能性がある。

T64のプラーク純化株では、NAの酵素活性部位を完全に欠失する株(T64LP4)が検出された。T64LP4はNAの活性を欠失しているにもかかわらず大きなプラークを形成し、37°Cでは結合していたニワトリ赤血球から遊出した。T64LP4のHAにはK153E及びM257I変異が確認された。HAの153-157番アミノ酸は受容体結合領域の近傍に位置する。<sup>90)</sup> したがって、これらの変異がHAの受容体結合活性に影響したのかもしれない。さらに、153番アミノ酸の変異は、塩基性アミノ酸リシンから酸性アミノ酸グルタミン酸への変異であった。そのため、この変異は陰性に荷電するシアル酸とHAとの親和性を弱める可能性が大きい。ウイルスと宿主細胞表面の受容体との結合力が減弱したため、NA非依存性にT64LP4が赤血球から遊出したものと考えられる。HAの受容体結合活性

と NA の受容体破壊活性のバランスが、ウイルスの増殖能及び病原性の決定に重要である。<sup>54-56)</sup> HA と NA の活性バランスに不備がある場合、限定的な複製を繰り返すなかで HA または NA もしくはその両者が変異し、高増殖性のウイルスに変化することが報告されている。<sup>91)</sup>

T64LP4 感染細胞の培養上清中のウイルス量は、親株である T64 の約 1/1,000 であった。細菌由来のシアリダーゼを添加したところ、2 時間でウイルス量が約 40 倍に増加した。この成績は、細胞表面に捕捉されていた新生ウイルス粒子の受容体が細菌のシアリダーゼによって破壊され、その結果、遊離してきたことを示唆する。Mori ら<sup>92)</sup> は、インフルエンザウイルスが NA 非依存性に cell-to-cell 感染により隣の細胞に伝播することを報告している。T64LP4 は粒子の産生そのものは親株と同等以上であった。NA 非依存性の cell-to-cell 感染によって、大きいプラークを形成したと考えられる。ヒトの唾液にはシアリダーゼ活性があり、上部気道に存在している *Streptococcus pneumoniae* などの細菌はシアリダーゼを産生する。これらの外来性シアリダーゼは、T64LP4 のようなウイルスの放出を助ける。<sup>93)</sup> 現在インフルエンザの治療に用いられている NA 阻害剤は、細菌由来のシアリダーゼには効果が無い。患者の保有している細菌由来のシアリダーゼがウイルス感染に関与した場合、NA 阻害剤の効果を減弱させる恐れがある。

T64LP4 はウイルス粒子の産生には影響が無いこと、また、cell-to-cell 感染により未感染細胞への感染も可能であることが分かった。また、NA の酵素活性領域を欠失するため、すべての NA 阻害剤が T64LP4 には無効である。このようなウイルスに対する治療法は現在のところ確立されていない。新型のみならず季節性インフルエンザの流行に備え、新たなメカニズムの新薬の開発と薬剤の適正使用のみならず、臨床分離株に対する監視が重要である。

## 総括

今回の研究では、A型インフルエンザウイルスの全ゲノムを増幅する簡便な方法を開発し、本法を用いて鳥類インフルエンザウイルスの疫学調査を実施した。さらに、本学におけるA(H1N1)pdm09の流行状況を解析し、以下の成績を得た。

1. わずか1組のプライマー対を用いてA型インフルエンザウイルスのゲノム8分節の全長を増幅した。本法を用いてHA及びNA亜型の判別にも成功した。また、DI-RNA分節の検出も容易に出来ることが分かった。
2. 全ゲノム増幅法を用いて、野鳥に由来する多様なインフルエンザウイルスの亜型の判別にも成功した。本法は未知の亜型のインフルエンザウイルスへの応用が可能である。
3. ゲノム解析の結果、2008年に渡りカモの糞便から分離されたA/duck/Hokkaido/128/2008(H5N1)は、ヒトに感染する恐れのない低病原性株であると推察された。
4. 2009年に本学クリニックで分離された70株のA(H1N1)pdm09は、HA遺伝子が3グループ、NA遺伝子が2グループに分けられた。2度の学年閉鎖では、異なるグループのウイルスが流行していたことが分かった。
5. オセルタミビル低感受性を示したA(H1N1)pdm09のプラーク純化株から、すべてのNA阻害剤に耐性を示すと考えられるNA活性を欠損する株が検出された。

簡便なA型インフルエンザウイルス全ゲノム増幅法及び亜型判別法の開発は、インフルエンザウイルスの疫学調査のみならず、ワクチン開発、ウイルス遺伝子の機能解析に極めて有用である。

## 謝辞

本研究に際して、終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 岡崎克則教授に心より深く感謝いたします。

本論文の審査過程において数々のご助言とご指導を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 青木隆教授，大倉一枝教授，島村佳一教授に深謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，有益なご教示を賜りました北海道医療大学薬学部 大澤宜明講師に深く感謝いたします。

また，本研究を遂行するにあたり，鼻腔スワブの採取にご協力いただきました北海道医療大学歯学部歯科内科クリニック 家子正裕教授，高橋伸彦准教授ならびに看護師の皆様は厚くお礼申し上げます。

最後に，終始暖かいご支援をいただきました北海道医療大学薬学部分子生命科学講座の皆様，暖かく見守ってくれたすべての方に感謝いたします。

平成26年3月

井上 恵美

## 引用文献

1. Lamb R. A., Krug R. M., Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, Knipe D. M., Howley P. M. (eds) : Field's Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1647-1689 (2007).
2. Helenius A., Unpacking the incoming influenza virus, *Cell*, **69**, 577-578 (1992).
3. Skehel J. J., Bayley P. M., Brown E. B., Martin S. R., Waterfield M. D., White J. M., Wilson I. A., Wiley D. C., Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 968-972 (1982).
4. Takeda M., Pekosz A., Shuck K., Pinto L. H., Lamb R. A., Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture, *J. Virol.*, **76**, 1391-1399 (2002).
5. Murti K. G., Webster R. G., Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy, *Virology*, **149**, 36-43 (1986).
6. リレンザ® インタビューフォーム (グラクソ・スミスクライン) (2013).
7. タミフル® インタビューフォーム (中外製薬) (2013).
8. 鈴木康夫, インフルエンザウイルスの受容体と宿主変異の分子機構, *ウイルス*, **51**, 193-200 (2001).
9. Callan R. J., Early G., Kida H., Hinshaw V. S., The appearance of H3 influenza viruses in seals, *J. Gen. Virol.*, **76**, 199-203 (1995).
10. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y., Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol. Rev.*, **56**, 152-179 (1992).
11. Hinshaw V. S., Bean W. J., Geraci J., Fiorelli P., Early G., Webster R. G., Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale, *J. Virol.*, **58**, 655-656 (1986).
12. Klingeborn B., Englund L., Rott R., Juntti N., Rockborn G., An avian influenza A virus killing a mammalian species--the mink, *Arch. Virol.*, **86**, 347-351 (1985).
13. Fouchier R. A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T. M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B., Osterhaus A. D., Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls, *J. Virol.*, **79**, 2814-2822 (2005).

14. Hinshaw V. S., Webster R.G., The natural history of influenza A virus, ed. By Basic and applied influenza research, CRC Press, Inc., Boca Raton. Fla., pp. 79-104 (1982).
15. Kida H., Yanagawa R., Matsuoka Y., Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response, *Infect. Immun.*, **30**, 547-553 (1980).
16. Ito T., Okazaki K., Kawaoka Y., Takada A., Webster R. G., Kida H., Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs, *Arch. Virol.*, **140**, 1163-1172 (1995).
17. Rogers G. N., Paulson J. C., Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin, *Virology*, **127**, 361-373 (1983).
18. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y., Avian flu: influenza virus receptors in the human airway, *Nature*, **440**, 435-436 (2006).
19. Ito T., Couceiro J. N., Kelm S., Baum L. G., Krauss S., Castrucci M. R., Donatelli I., Kida H., Paulson J. C., Webster R. G., Kawaoka Y., Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential, *J. Virol.*, **72**, 7367-7373 (1998).
20. Viboud C., Grais R. F., Lafont B. A., Miller M. A., Simonsen L., Multinational Influenza Seasonal Mortality Study Group, Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic, *J. Infect. Dis.*, **192**, 233-248 (2005).
21. World Health Organization, Influenza pandemic plan. The role of WHO and guidelines for national and regional planning, <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsredc991.pdf> (1999).
22. Patterson K. D., Pyle G. F., The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic, *Bull. Hist. Med.*, **65**, 4-21 (1991).
23. Johnson N. P., Mueller J., Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic, *Bull. Hist. Med.*, **76**, 105-115 (2002).
24. Dawood F. S., Jain S., Finelli L., Shaw M. W., Lindstrom S., Garten R. J., Gubareva L. V., Xu X., Bridges C. B., Uyeki T. M., Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans, *N. Engl. J. Med.*, **360**, 2605-2615 (2009).
25. Schnitzler S. U., Schnitzler P., An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review, *Virus Genes*, **39**, 279-292 (2009).

26. Centers for Disease Control and Prevention, Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans--Hong Kong, May-December 1997, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **46**, 1204-1207 (1997).
27. World Health Organization, Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO – update 29 August 2013, [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/) (2013).
28. Fouchier R. A., Schneeberger P. M., Rozendaal F. W., Broekman J. M., Kemink S. A., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G. F., Schutten M., Van Doornum G. J., Koch G., Bosman A., Koopmans M., Osterhaus A. D., Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1356-1361 (2004).
29. Parry J., H7N9 avian flu infects humans for the first time, *Br. Med. J.*, **346**, f2151 (2013).
30. World Health Organization, Global alert and response. Human infection with avian influenza A (H7N9) virus – update 11 August 2013, [http://www.who.int/csr/don/don\\_updates/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/don_updates/en/index.html) (2013).
31. Le Q. M., Kiso M., Someya K., Sakai Y. T., Nguyen T. H., Nguyen K. H., Pham N. D., Ngyen H. H., Yamada S., Muramoto Y., Horimoto T., Takada A., Goto H., Suzuki T., Suzuki Y., Kawaoka Y., Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus, *Nature*, **437**, 1108 (2005).
32. Office International des Epizooties, Paris, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 4th ed, Part 2, [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.14\\_RVF.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.14_RVF.pdf) (2008).
33. Desselberger U., Racaniello V. R., Zazra J. J., Palese P., The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity, *Gene*, **8**, 315-328 (1980).
34. Skehel J. J., Hay A. J., Nucleotide sequence at the 5' terminal of influenza virus RNAs and their transcripts, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1207-1219 (1978).
35. Adeyefa C. A., Quayle K., Mccauley J. W., A rapid method for the analysis of influenza virus genes: application to the reassortment of equine influenza virus genes, *Virus Res.*, **32**, 391-399 (1994).

36. Alvarez A. C., Brunck M. E., Boyd V., Lai R., Virtue E., Chen W., Bletchly C., Heine H. G., Barnard R., A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus, *Viol. J.*, **5**, 77 (2008).
37. Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webser R. G., Perez D. R., Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses, *Arch. Virol.*, **146**, 2275-2289 (2001).
38. Fouchier R. A., Bestebroer T. M., Herfst S., Van Der Kemp L., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D., Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequence in the matrix gene, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4096-4101 (2000).
39. Lee M. S., Chang P. C., Shien J. H., Cheng M. C., Shieh H. K., Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J. Virol. Methods*, **97**, 13-14 (2001).
40. Phipps L. P., Essen S. C., Brown I. H., Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region, *J. Virol. Methods*, **122**, 119-122 (2004).
41. Chambers T. M., Webster R. G. Defective interfering virus associated with A/chicken/Pennsylvania/83 influenza virus, *J. Virol.*, **61**, 1517-1523 (1987).
42. Nakajima K., Ueda M., Sugiura A., Origin of small RNA in von Magnus particles of influenza virus, *J. Virol.*, **29**, 1142-1148 (1979).
43. Ueda M., Nakajima K. Sugiura A., Extra RNAs of von Magnus particles of influenza virus cause reduction of particular polymerase genes, *J. Virol.*, **34**, 1-8 (1980).
44. Tong S., Li Y., Rivaille P., Conrardy C., Castillo D. A., Chen L. M., Recuenco S., Ellison J. A., Davis C. T., York I. A., Turmelle A. S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M. R., Tang K., Rowe L. A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K. A., Cox N. J., Anderson L. J., Rupprecht C. E., Donis R. O., A distinct lineage of influenza A virus from bats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4269-4274 (2012).
45. Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R. H., Kawaoka Y., Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles, *Nature*, **439**, 490-492 (2006).
46. Zhou B., Donnelly M. E., Scholes D. T., St George K., Hatta M., Kawaoka Y., Wentworth D. E., Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and swine origin human influenza A viruses, *J. Virol.*, **83**, 10309-10313 (2009).

47. Horimoto T., Kawaoka Y., Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus, *J. Virol.*, **68**, 3120-3128 (1994).
48. Horimoto T., Nakayama K., Smeekens S. P., Kawaoka Y., Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses, *J. Virol.*, **68**, 6074-6078 (1994).
49. Horimoto T., Kawaoka Y., Pandemic threat posed by avian influenza A viruses, *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 129-149 (2001).
50. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M. R., Donatelli I., Kawaoka Y., Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals, *J. Virol.*, **74**, 8502-8512 (2000).
51. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M. Q., Nidom C. A., Sakai-Tagawa Y., Muramoto Y., Ito M., Kiso M., Horimoto T., Shinya K., Sawada T., Kiso M., Usui T., Murata T., Lin Y., Hay A., Haire L. F., Stevens D. J., Russell R. J., Gamblin S. J., Skehel J. J., Kawaoka Y., Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors, *Nature*, **444**, 378-382 (2006).
52. Li J., Zu Dohna H., Cardona C. J., Miller J., Carpenter T. E., Emergence and genetic variation of neuraminidase stalk deletions in avian influenza viruses, *PLoS One*, **6**, e14722 (2011).
53. Zhou H., Yu Z., Hu Y., Tu J., Zou W., Peng Y., Zhu J., Li Y., Zhang A., Yu Z., Ye Z., Chen H., Jin M., The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus, *PLoS One*, **4**, e6277 (2009).
54. Mitnaul L. J., Matrosovich M., Castrucci M. R., Tuzikov A. B., Bovin N. V., Kobasa D., Kawaoka Y., Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus, *J. Virol.*, **74**, 6015-6020 (2000).
55. Hughes M. T., McGregor M., Suzuki T., Suzuki Y., Kawaoka Y., Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity, *J. Virol.*, **75**, 3766-3770 (2001).
56. Wagner R., Matrosovich M., Klenk H. D., Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections, *Rev. Med. Virol.*, **12**, 159-166 (2002).

57. Hatta M., Hatta Y., Kim J. H., Watanabe S., Shinya K., Nguyen T., Lien P. S., Le Q. M., Kawaoka Y., Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice, *PLoS Pathog.*, **3**, 1374-1379 (2007).
58. Rameix-Welti M. A., Tomoiu A., Dos Santos Afonso E., Werf S., Naffakh N., Avian influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection, *J. Virol.*, **83**, 1320-1331 (2009).
59. Li Z., Chen H., Jiao P., Deng G., Tian G., Li Y., Hoffmann E., Webster R. G., Matsuoka Y., Yu K., Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model, *J. Virol.*, **79**, 12058-12064 (2005).
60. García-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S., Levy D. E., Durbin J. E., Palese P., Muster T., Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems, *Virology*, **252**, 324-330 (1998).
61. Chen Z., Li Y., Krug R. M., Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery, *EMBO J.*, **18**, 2273-2283 (1999).
62. Seo S. H., Hoffmann E., Webster R. G., Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.*, **8**, 950–954 (2002).
63. Dankar S. K., Wang S., Ping J., Forbes N. E., Keleta L., Li Y., Brown E. G., Influenza A virus NS1 gene mutations F103L and M106I increase replication and virulence, *Virol. J.*, **8**, 13 (2011).
64. Jiao P., Tian G., Li Y., Deng G., Jiang Y., Liu C., Liu W., Bu Z., Kawaoka Y., Chen H., A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice, *J. Virol.*, **82**, 1146-1154 (2008).
65. Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D., Fouchier R. A., Global patterns of influenza A virus in wild birds, *Science*, **312**, 384-388 (2006).
66. Butler D., Alarms ring over bird flu mutations, *Nature*, **439**, 248-249 (2006).
67. World Health Organization, Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus, [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/WHO\\_H7N9\\_review\\_31May13.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf) (2013).
68. Gaush C. R., Smith T. F., Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells, *Appl. Microbiol.*, **14**, 588-594 (1968).

69. Alexander D. J., Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009, *Avian Pathol.*, **40**, 547-558 (2011).
70. Ludwig S., Schultz U., Mandler J., Fitch W. M., Scholtissek C., Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses, *Virology*, **183**, 566-577 (1991).
71. Okazaki K., Takada A., Ito T., Imai M., Takakuwa H., Hatta M., Ozaki H., Tanizaki T., Nagano T., Ninomiya A., Demenev V. A., Tyaptirganov M. M., Karatayeva T. D., Yamnikova S. S., Lvov D. K., Kida H., Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia, *Arch. Virol.*, **145**, 885-893 (2000).
72. Siembieda J. L., Johnson C. K., Cardona C., Anchell N., Dao N., Reisen W., Boyce W., Influenza A viruses in wild birds of the Pacific flyway, 2005-2008, *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **10**, 793-800 (2010).
73. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R. G., Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics, *J. Virol.*, **63**, 4603-4608 (1989).
74. Smith G. J., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S. J., Worobey M., Pybus O. G., Ma S. K., Cheung C. L., Raghvani J., Bhatt S., Peiris J. S., Guan Y., Rambaut A., Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic, *Nature*, **459**, 1122-1125 (2009).
75. 国立感染症研究所, インフルエンザウイルス (季節性+AH1pdm) 分離・検出状況 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/influ09.html> (2010).
76. 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 P. A., 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*, **460**, 1021-1025 (2009).

77. Nelson M., Spiro D., Wentworth D., Beck E., Fan J., Ghedin E., Halpin R., Bera J., Hine E., Proudfoot K., Stockwell T., Lin X., Griesemer S., Kumar S., Bose M., Viboud C., Holmes E., Henrickson K., The early diversification of influenza A/H1N1pdm, *PLoS Curr.*, **1**, RRN1126 (2009).
78. Hauge S. H., Dudman S., Borgen K., Lackenby A., Hungnes O., Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08, *Emerg. Infect. Dis.*, **15**, 155-162 (2009).
79. World Health Organization, Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir, [http://www.who.int/influenza/patient\\_care/antivirals/oseltamivir\\_summary/\\_south\\_2008/en/index.html](http://www.who.int/influenza/patient_care/antivirals/oseltamivir_summary/_south_2008/en/index.html) (2008).
80. 国立感染症研究所, 2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報], <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/30/350/pr3503.html> (2009).
81. Morlighem J. E., Aoki S., Kishima M., Hanami M., Ogawa C., Jalloh A., Takahashi Y., Kawai Y., Saga S., Hayashi E., Ban T., Izumi S., Wada A., Mano M., Fukunaga M., Kijima Y., Shiomi M., Inoue K., Hata T., Koretsune Y., Kudo K., Himeno Y., Hirai A., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y., Iwatsuki-Horimoto K., Kawaoka Y., Hayashizaki Y., Ishikawa T., Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic, *PLoS One*, **6**, e18956 (2011).
82. Bragstad K., Nielsen L. P., Fomsgaard A., The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study, *Virology*, **5**, 40 (2008).
83. Kawano H., Haruyama T., Hayashi Y., Sinoda Y., Sonoda M., Kobayashi N., Genetic analysis and phylogenetic characterization of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses that found in Nagasaki, Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **64**, 195-203 (2011).
84. Brownlee G. G., Fodor E., The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 1871-1876 (2001).
85. Stevens J., Blixt O., Paulson J. C., Wilson I. A., Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 857-864 (2006).

86. Mak G. C., Au K. W., Tai L. S., Chuang K. C., Cheng K. C., Shiu T. C., Lim W., Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease, *Euro Surveill.*, **15**, 19534 (2010).
87. Hurt A. C., Lee R. T., Leang S. K., Cui L., Deng Y. M., Phuah S. P., Caldwell N., Freeman K., Komadina N., Smith D., Speers D., Kelso A., Lin R. T., Maurer-Stroh S., Barr I. G., Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A (H1N1) 2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to an S247N neuraminidase mutation, *Euro Surveill.*, **16**, pii=19884 (2011).
88. Seibert C. W., Rahmat S., Krammer F., Palese P., Bouvier N. M., Efficient transmission of pandemic H1N1 influenza viruses with high-level oseltamivir resistance, *J. Virol.*, **86**, 5386-5389 (2012).
89. Boltz D. A., Douangneun B., Phommachanh P., Sinthasak S., Mondry R., Obert C., Seiler P., Keating R., Suzuki Y., Hiramatsu H., Govorkova E. A., Webster R. G., Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic, *J. Gen. Virol.*, **91**, 949-959 (2010).
90. Yang H., Carney P., Stevens J., Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin, *PLoS Curr.*, **2**, RRN1152 (2010).
91. Hughes M. T., Matrosovich M., Rodgers M. E., McGregor M., Kawaoka Y., Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice, *J. Virol.*, **74**, 5206–5212 (2000).
92. Mori K., Haruyama T., Nagata K., Tamiflu-resistant but HA-mediated cell-to-cell transmission through apical membranes of cell-associated influenza viruses, *PLoS One*, **6**, e28178 (2011).
93. Nishikawa T., Shimizu K., Tanaka T., Kuroda K., Takayama T., Yamamoto T., Hanada N., Hamada Y., Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor, *PLoS One*, **7**, e45371 (2012).