

## 平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

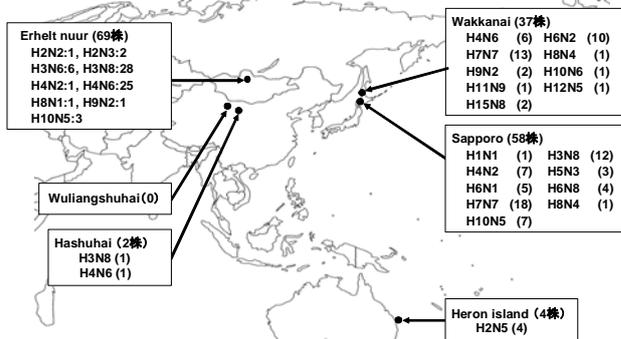
ふりがな(ローマ字)		KIDA HIROSHI					
①研究代表者氏名		喜田 宏		②所属研究機関・部局・職		北海道大学・大学院獣医学研究科・教授	
③研究課題名	和文	動物インフルエンザウイルスの生態解明と新型ウイルス対策					
	英文	Ecology and pandemic planning of animal influenza virus					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		35,400	14,700	14,700	14,400	0	79,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
喜田 宏	北海道大学・大学院獣医学研究科・教授	微生物学	研究総括、ワクチンの試作と評価、WHO動物インフルエンザセンターおよびグローバルサーベイランスネットワークの拡充・強化 動物モデルを用いたインフルエンザ脳症およびインフルエンザウイルスの神経向性の病理学的解析 インフルエンザウイルスの分離と同定、生物性状と遺伝子の解析ならびに系統保存（17年度より分担者から除外） ワクチン候補株の系統保存、ベッドサイドインフルエンザ診断法の開発と実用化の検討 インフルエンザウイルスの病原性の分子基盤の解明と想定新型ウイルスの人工作出 インフルエンザウイルスの宿主域、組織向性および病原性決定因子の同定 インフルエンザウイルスのレセプター結合阻害薬の合成 インフルエンザ粘膜ワクチンの開発と実用化の検討				
梅村 孝司	北海道大学・大学院獣医学研究科・教授	病理学					
岡崎 克則	北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授	ウイルス学					
迫田 義博	北海道大学・大学院獣医学研究科・助手	ウイルス学					
河岡 義裕	東京大学・医科学研究所・教授	ウイルス学					
伊藤 壽啓	鳥取大学・農学部・教授	公衆衛生学					
鈴木 康夫	静岡県立大学・薬学部・教授	薬学					
小笠原 一誠	滋賀医科大学・医学部・教授	免疫学・病理学					
海外共同研究者 R. G. Webster	セントジュード小児研究病院・ウイルス学部門・部門長	ウイルス学	WHOインフルエンザサーベイランスネットワークの構成メンバーとして本計画に協力				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究の目的は、家禽と家畜のインフルエンザの被害を未然に防ぐとともに、ヒトの新型インフルエンザウイルスの出現を予測し、より安全でより有効なワクチンならびに新規抗インフルエンザ薬を開発、実用化することによってインフルエンザの予防と制圧法を確立することである。その概要は次の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>動物インフルエンザの疫学調査を世界規模で継続実施してカモ、家禽および家畜における動物ウイルスの分布を明らかにする。ウイルスの宿主域決定因子を解明し、ヒト、家禽と家畜に新型ウイルスとして出現する可能性が高いウイルスの抗原亜型を予測する。</li> <li>調査で分離されるウイルス株の生物性状と遺伝子を解析して各抗原亜型（H1～H15、N1～N9）のワクチン候補株を選出し、これらを系統保存・管理・供給する。</li> <li>ウイルスの組織向性および病原性決定因子を同定してインフルエンザの伝播と重篤化メカニズムを究明する。</li> <li>ウイルスの感染門戸である呼吸器粘膜と全身の免疫を賦活する安全なワクチンを開発し、新型ウイルスによる大流行のみならず変異ウイルスによって毎年繰り返される流行を防止する。</li> <li>現在実用化されている抗インフルエンザ薬とは標的の異なる新規薬剤を開発し、インフルエンザの多剤併用療法を可能にする。</li> <li>ベッドサイド迅速診断法を開発・実用化して感染早期の治療を可能にするとともに疫学調査に応用して新型ウイルスの出現予測ならびに動物とヒトのインフルエンザ発生の早期検出と対応に資する。</li> </ol>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1. 動物インフルエンザのグローバルサーベイランスネットワークの拡充・強化 (喜田、岡崎、河岡、伊藤、迫田)

日本、中国、モンゴル、オーストラリアにおいて、渡りガモおよびミズナギドリ等の糞便合計3,718検体から170株のインフルエンザウイルスを分離同定した(図1)。また、インフルエンザのサーベイランスの国際連携を強化するために、2004年8月北海道大学において「WHO動物インフルエンザトレーニングコース」を19カ国の研修生を迎えて実施した。

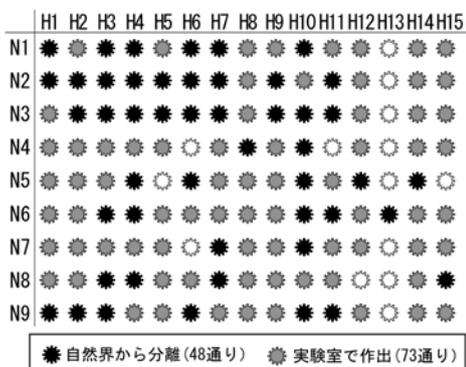
図1. グローバルサーベイランスで分離・同定されたインフルエンザウイルス (2004-2005年度)



2. インフルエンザワクチン候補株の選抜と系統保存 (喜田、岡崎、伊藤、迫田)

分離されたウイルスはHA亜型 (H1-H15) とNA亜型 (N1-N9) に基づいて系統保存した。HAとNAの組み合わせに基づく135通りのうち、現在までに121通りのウイルスをワクチン候補株として保存した(図2)。

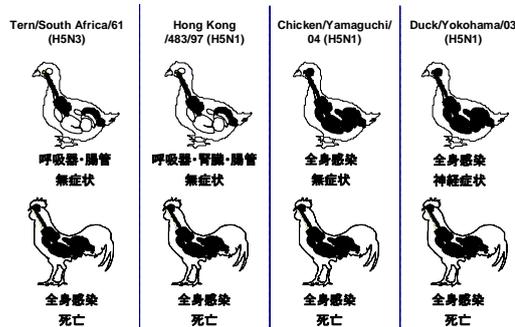
図2. インフルエンザワクチンの候補株ライブラリー



3. インフルエンザウイルスの病原性に関する因子の同定 (喜田、河岡、伊藤)

高病原性鳥インフルエンザが国内で発生した。分離されたウイルスA/chicken/Yamaguchi/7/04(H5N1)の鳥類および哺乳類に対する病原性を比較解析した。その結果、鳥類では全身感染を引き起こすが、哺乳類に対しては局所感染に止まるか、または全く感染しないことがわかった。また、カモに対して強い病原性を示す高病原性鳥インフルエンザウイルスは、脳への伝播・増殖が早いことを明らかにした(図3)。さらにH9N2亜型の鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性は、細菌の混合感染により増強されることが判った。

図3. カモとニワトリにおけるH5鳥インフルエンザウイルスの病原性の違い



水鳥由来インフルエンザウイルスをニワトリに接種し、継代することによって、体内で増殖可能な適応変異株を得た。H5亜型水鳥由来ウイルスとニワトリに適応した変異株の全ゲノム遺伝子の比較解析を行った結果、HA遺伝子に最も変異が多く、さらにそのうちの1ヶ所はHA分子頭部のレセプター結合部位付近に糖鎖の付加を起こす変異であった。このHA蛋白分子の変異が水鳥由来インフルエンザウイルスのニワトリへの宿主適応に関与するものと考えられる。

4. インフルエンザ脳症発病メカニズムの解明 (梅村、喜田)

小児の急性脳症であるライ症候群はインフルエンザウイルス感染と解熱剤投与に起因すると考えられているが、実証されていない。経鼻接種されたインフルエンザウイルスはニワトリでは血行性に中枢神経系へ、マウスでは経神経性に中枢神経へ到達して脳炎を惹起するので、これらの脳炎モデルに対する解熱剤の影響を検討した。その結果、解熱剤はマウスにおけるインフルエンザウイルスの経神経伝播には影響を与えないが、ニワトリにおける血行性伝播を著しく増強することが分かった。

5. インフルエンザ粘膜ワクチンの開発 (小笠原、喜田)

様々な HA 亜型のホルマリン不活化完全粒子ワクチンを試製した。これを鼻腔免疫したマウスは強毒 H5N1 ウイルスの攻撃に耐えた。この成績から、不活化ウイルス粒子の経鼻接種は、異なる亜型ウイルスの感染防御能を賦与することがわかった。

ホルマリン不活化した H5N1 インフルエンザウイルスは、樹状細胞の活性化能が弱く、マウスに投与しても生体内で CTL を十分に活性化できないことが判明した。そのため、アジュバント活性を有する Toll-like receptor リガンドを探索している。

6. 新規抗インフルエンザウイルス薬の開発 (鈴木、喜田)

新規大量合成された3-F-シアリルフォスファチジルエタノールアミンは、インフルエンザウイルスの血球凝集 (レセプター結合) 活性、およびノイラミニダーゼ活性の両方を阻害することが細胞レベルで証明された。この3-F-シアリルフォスファチジルエタノールアミンをはじめ、一連のインヒビター候補物質の効果をマウスモデルで評価する計画である。

7. ペットサイド早期迅速インフルエンザ診断法の開発 (迫田、喜田)

A型およびB型インフルエンザウイルスのNS1蛋白に対するモノクローン抗体を作成した。これらの抗体を用いて試作された簡易診断キットは、A型とB型のウイルス感染をそれぞれ特異的診断できることがわかった。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

2003年末から東アジア各国においてH5N1亜型ウイルスの感染による高病原性鳥インフルエンザが発生し、ヒトへの感染・死亡例も報告された。国内においても2004年初めに山口県、大分県、京都府で発生し、大量のニワトリの処分や家禽の移動制限により養鶏業界に打撃を与えた。人獣共通感染症および食の安全の観点からも鳥インフルエンザの被害を未然に防ぐ方策の立案が重要であることが再認識された。

本研究プロジェクトで推進してきた研究とその成果は、今回の鳥インフルエンザ問題において以下の点で社会に大きく貢献するものとなった。

### 1. 国内での高病原性鳥インフルエンザ発生の原因究明と感染防止対策立案への貢献

今回国内で分離されたH5N1ウイルスとこれまでに野生水禽および家禽から分離されたH5亜型の鳥インフルエンザウイルスの分子系統解析を行った結果、今回国内で分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスは、グローバルサーベイランスで分離される野生水禽由来のH5鳥インフルエンザウイルスと遺伝学的に異なる系統であることが分かった。このことは、野生水禽由来のウイルスをもとに日本国内でウイルスが毒力を獲得したのではなく、既に家禽に対して毒力を獲得していたH5ウイルスが何らかの経路で日本国内に持ち込まれたことを示唆するものである。

動物接種試験の成績から、今回国内で発生した高病原性鳥インフルエンザ起因ウイルスは、鳥類に対しては高い病原性を有するが、哺乳類に対しては病原性が低いことがわかった。特に、野鳥でも全身感染を起こすこと、またヒトの新型インフルエンザウイルス出現の鍵となるブタでウイルスが増殖しなかったことはウイルス伝播経路、感染防止対策を考える上で重要な知見となった。

### 2. 家禽用インフルエンザワクチンの開発

ヒトと異なり、鳥インフルエンザの蔓延防止にはワクチンを使用せず、迅速な診断と摘発淘汰が現在の世界標準である。しかし、万が一の事態に備えたワクチンの備蓄は必要である。今回の研究プロジェクトの中で系統保存されたワクチン候補株から適切な抗原性のウイルス株を選択し、国内のワクチン製造株として供給した。ワクチン株の迅速な供給は、先回り対策を目指した研究の積み重ねの成果と考える。

### 3. アジア各国における診断技術の向上

グローバルサーベイランスの拡充と強化を目的として2004年8月、北海道大学において「WHO動物インフルエンザの診断とサーベイランスに関するトレーニングコース」を19カ国の研修生を迎えて実施した。本研修会や日頃からの研修生の受け入れは、アジア各国の動物インフルエンザに対する知識と診断技術の向上が目的であるが、これは鳥インフルエンザの被害を最小限にとどめ、さらには家禽からヒトへのウイルス伝播を未然に防ぐために必須の方策である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

<学術論文>

Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Maruyama, T., Arai, T., and Miyazaki, N. (2003): Influenza virus infection in seal (*Phocidae*): seroepidemiological survey of influenza virus in Caspian seals (*Phoca caspica*). *Otsuchi Marine Sci.* 28, 39-44.

Makarova, N. V., Ozaki, H., Kida, H., Webster, R. G., and Perez, D. (2003): Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology* 310, 8-15.

○ Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2003): Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 21, 3212-3218.

Tanaka, H., Park, C-H., Ninomiya, A., Ozaki, H., Takada, A., Umemura, T., and Kida, H. (2003): Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet. Microbiol.* 95, 1-13.

Liu, J., Okazaki, K., Ozaki, H., sakoda, Y., Wu, Q., Chen, F., and Kida, H. (2003): H9N2 influenza viruses prevalent in poultry in China are phylogenetically distinct from A/quail/Hong Kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H5N1 Hong Kong/97 virus. *Avian Pathol.* 32, 551-560.

Liu, J. H., Okazaki, K., Shi, W. M., Wu, Q. M., Mweene, A. S., and Kida, H. (2003): Phylogenetic Analysis of neuraminidase gene of H9N2 influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002. *Virus Genes* 27, 197-202.

Sunden, Y., Park, C. H., Matsuda, K., Anagawa, A., Kimura, T., Ochiai, K., Kida, H., and Umemura, T. (2003): The effects of antipyretics on influenza virus encephalitis in mice and chicks. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1185-1188.

Park, C. H., Matsuda, K., Sunden, Y., Ninomiya, A., Takada, A., Ito, H., Kimura, T., Ochiai, K., Kida, H., and Umemura, T. (2003): Persistence of viral RNA segments in the central nervous system of mice after recovery from acute influenza A virus infection. *Vet. Microbiol.* 97, 259-268.

Ishiguro, N., Takada, A., Yoshioka, M., Ma, X., Kikuta, H., Kida, H., and Kobayashi, K. (2004): Induction of interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon- $\gamma$  from human endothelial cells infected with Influenza A virus. *Arch. Virol.* 149, 17-34.

Matsuda, K., Park, C. H., Sunden, T., Kimura, T., Ochiai, K., Kida, H., and Umemura, T. (2004): The vagus nerve is one route of transneuronal invasion for intranasally inoculated influenza A virus in mice. *Vet. Pathol.* 41, 101-107.

Yazawa, S., Okada, M., Ono, M., Fujii, S., Okuda, Y., Shibata, I., and Kida, H. (2004): Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 98, 221-228.

Ohishi, K., Kishida, N., Ninomiya, A., Kida, H., Takada, Y., Miyazaki, N., Boltunov, A. N., and Maruyama, T. (2004): Antibodies to Human-Related H3 Influenza A Virus in Baikal Seals (*Phoca sibirica*) and Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol. Immunol.* 48, 905-909.

○ Kishida, K., Sakoda, Y., Eto, M., and Kida, H. (2004): Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch. Virol.* 149, 2095-2104.

Liu, J. H., Okazaki, K., Mweene, A., Bai, G. R., Shi, W. M., Mweene, A., and Kida, H. (2004): Interregional transmission of the internal protein genes of H2 influenza virus in migratory ducks from North America to Eurasia. *Virus Gene* 29, 81-86.

Liu, J. H., Okazaki, K., Mweene, A., Shi, W. M., Wu, Q. M., Su, J. L., Zhang, G. Z., Bai, G. R., and Kida, H. (2004): Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China. *Virus Genes* 29, 329-334.

Matsuda, K., Shibata, T., Sakoda, Y., Kida, H., Kimura, T., Ochiai, K., and Umemura, T. (2005): In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 86, 1131-1139.

○ Kishida, N., Sakoda, Y., Isoda, N., Matsuda, K., Eto, M., Sunaga, Y., Umemura, T., and Kida, H. (2005): Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. *Arch. Virol.* (in press)

Horimoto, T., Takada, A., Iwatsuki-Horimoto, K., and Kawaoka, Y. (2004): A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model. *Vaccine* 22, 2244-2247.

Iwatsuki-Horimoto, K., Kanazawa, R., Sugii, S., Kawaoka, Y., and Horimoto, T. (2004): The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor binding properties from a virulent avian influenza virus. *J. Gen. Virol.* 85, 1001-1005.

Shinya, K., Hamm, S., Hatta, M., Ito, H., Ito, T., and Kawaoka, Y. (2004): PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320, 258-266.

Shinya, K., Fujii, Y., Ito, H., Ito, T., and Kawaoka, Y. (2004): Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J. Virol.* 78, 3083-3088.

Nakamura, I., Kajino, K., Bamba, H., Itoh, H., Takikita, M., and Ogasawara, K. (2004): Phenotypic stability of mature dendritic cells tuned by TLR or CD40 to control the efficiency of cytotoxic T cell priming. *Microbiol. Immunol.* 48, 211-219.

Kogure, T., Suzuki, T., Takahashi, T., Miyamoto, D., Hidari, K.I.P.J., Chao-Tan, G., Ito, T., Kawaoka Y., and Suzuki, Y. (2005): Human trachea primary epithelial cells express both sialyl-2-3-Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconjugate J.* (in press)

Shinya, K., Sutou, A., Kawakami, M., Sakamoto, H., Umemura, T., Kawaoka, Y., and Ito, T. (2005): Neurovirulence of H7N7 influenza A virus: Brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice. *Arch. Virol.* (in press)

#### <国際学会>

Kishida, N., Eto, M., Sunaga, Y., Kida H. (2004): Enhancement of pathogenicity of H9N2 influenza A virus isolated from chicken in China by co-infection with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus paragallinarum*. In: International Congress Series 1263- Options for the Control of Influenza V, 481-485

Sakoda, Y., Ito, T., Okazaki, K., Takada, A., Ito, Y., Tamai, K., Okamatsu, M., Shortridge, K. F., Webster, R. G., Kida H. (2004): Preparation of a panel of avian influenza viruses of different subtypes for vaccine strains against future pandemics. In: International Congress Series 1263- Options for the Control of Influenza V, 674-677

Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A., Kawaoka, Y., Kida H. (2004): Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza virus infection in mice. In: International Congress Series 1263- Options for the Control of Influenza V, 618-621

#### <国内学会>

「H9N2 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼ分子のエピトープマッピング」岡松正敏、劉金華、潮田道子、迫田義博、喜田宏 第137回日本獣医学会学術集会(2004年、藤沢)

「ムクドリ、インコ、ミニブタの高病原性鳥インフルエンザウイルス A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)に対する感受性」迫田義博、岸田典子、磯田典和、松田一哉、衛藤真理子、須永裕、梅村孝司、喜田宏 第 138 回日本獣医学会学術集会 (2004 年、札幌)

「Evaluation of influenza A virus recombinant NS1 in diagnosis」Mweene Aaron、迫田義博、磯田典和、岸田典子、喜田宏 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)

「高病原性鳥インフルエンザウイルス A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)の鳥および哺乳動物に対する病原性」迫田義博、岸田典子、磯田典和、梅村孝司、喜田宏 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)

「高病原性鳥インフルエンザウイルスの鴨に対する病原性」岸田典子、迫田義博、磯田典和、梅村孝司、喜田宏 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)

「高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発 1. 野生水禽から分離された H5 インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」曾田公輔、磯田典和、岸田典子、迫田義博、喜田宏 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)

「高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発 2. 弱毒 H5N1 ウイルス株で試製したワクチンの感染防御効果」磯田典和、岸田典子、曾田公輔、迫田義博、喜田宏 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)

「動物インフルエンザのグローバルサーベイランスとすべての亜型ウイルスライブラリー」喜田宏、伊藤壽啓、高田礼人、ムウィネ アーロン、岸田典子、亀山健一郎、磯田典和、五十嵐寛高、迫田義博 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (2004 年、横浜)