

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 国際分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム

(英語) International Collaborative Research Program, The e-ASIA Joint Research Program (e-ASIA JRP)

研究開発課題名：(日本語) インドネシアで流行している H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのパンデミックリスク評価

(英語) Evaluation of the pandemic potential of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Indonesia

研究開発担当者 (日本語) 河岡 義裕

所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, Professor, Yoshihiro Kawaoka

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

和文

インドネシアで流行している H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子情報は限られている。例えば、インドネシアにおいて H5N1 ウイルスがどのように保持されてきたのか、さらに、現在流行している H5N1 ウイルスは、哺乳動物においてどのような伝播性・病原性を有するのか等については十分に理解されていない。

本研究では、その問題点を解決するために、インドネシアにおけるサーベイランス体制の構築を図り、H5N1 ウイルスの分離と、その遺伝子解析および病原性解析を行うことで、現在インドネシアで流行している H5N1 ウイルスの性状を把握し、パンデミックを起こすリスクの評価を行う。

当該年度、ニドム教授(アイルランガ大学 鳥インフルエンザリサーチセンター)らのグループは、河岡教授(東京大学 医科学研究所)らのグループとともに、ジャワ島の農業省およびカリマンタン島西部の地方自治体を訪問し、H5N1 ウイルス・サーベイランスのための検体採取と鳥インフルエンザ発生時の検体分与体制を強化した。さらに、ジャワ島およびカリマンタン島の鳥インフルエンザ発生地域での家禽、豚、鳥などからの検体採取と、ボランティアからの採血ならびに PBMC

分離を河岡教授らのグループとともに実施した。

ニドム教授らのグループは、2016年3月に採取した496検体を東京大学・医科学研究所・ウイルス感染分野に送付した。河岡教授のグループは、この検体から12株のインフルエンザウイルスを分離した。得られた12株について遺伝子解析を行ったところ、全て、高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスであり、12株とも全て2012年にベトナムからインドネシアに流入したと考えられているclade2.3.2.1に属するウイルスであり、従来からインドネシアで保持されてきたclade2.1.3ウイルスとは異なることが分かった。一部のウイルスのPB2遺伝子は、2004年にマレーシアで分離されたH5N2ウイルスに由来しており、他のウイルスとの遺伝子交雑が起きていたことがわかった。また、HAやNA遺伝子の解析結果から、レセプター特異性や薬剤感受性に関わると推測される変異は確認されなかった。2010年から2016年に採取した検体から分離した23株について、ヒト呼吸器上皮細胞(A549細胞)およびニワトリ線維芽細胞(DF-1細胞)における増殖性を解析したところ、いずれの株もDF-1細胞では効率よく増殖したが、ヒト呼吸器上皮細胞においては、株により増殖性に大きな違いがあることを明らかにした。

ノイマン研究教授(ウイスコンシン大学 マディソン校)のグループは、インドネシアの家禽から分離したH5N1ウイルスのマウスにおける病原性を比較解析した。その結果、clade2.3.2.1ウイルスはclade2.1.3ウイルスに比べ、マウスにおいて高い病原性を示すことを明らかにした。

以上より、現在、インドネシアで流行しているH5N1ウイルスの遺伝子型や哺乳類由来の培養細胞における増殖性およびマウスにおける病原性を明らかにし、流行状況把握に貢献する成績を得た。

## 英文

Highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses cause outbreaks among poultry in Indonesia every year, leading to human infections. It is imperative that we understand the current situation regarding H5N1 virus circulation in Indonesia and characterize these viruses to assess their pandemic potential and to prepare for a potential H5N1 pandemic.

To this end, the Indonesian research team has strengthened its influenza surveillance systems to collect swab samples from poultry and pigs in outbreak areas. For example, they have strengthened their relationship with the local government of West Kalimantan and West Java province so that H5N1 viruses isolated in these areas can be promptly provided to the Indonesian team. In March 2017, the Indonesian team conducted surveillance on Java Island and also on Kalimantan Island with the Tokyo research team. They collected a total of 496 swab samples, which were sent to Tokyo for analysis.

The Tokyo research team isolated viruses from the 496 swab samples by using embryonated chicken eggs in their BSL3 facility. Twelve H5N1 viruses were isolated from these samples. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) genes showed that all 12 H5N1 viruses belonged to clade 2.3.2.1. Clade 2.3.2.1 viruses were thought to have been introduced from Vietnam in 2012. Whole genome sequencing showed that some of the viruses isolated in 2016 possessed a PB2 segment from a different source. Blast searches showed that the virus possessing the closest PB2 was a duck H5N2 virus isolated in Malaysia in 2004, suggesting that reassortment occurred between the H5N1 viruses and viruses of a different subtype. Analysis of the HA and neuraminidase (NA) amino acid sequences revealed that none of the isolates have acquired any mutations that are known to confer human-type receptor recognition or resistance to NA-inhibitor drugs, respectively. In March

2017, the Tokyo research team visited Indonesia and conducted surveillance with the Indonesian team in areas of East Java and West Kalimantan.

The Tokyo research team also analyzed the replicative ability in cell culture (human respiratory epithelial cells and chicken embryo fibroblast cells) of 23 H5N1 viruses isolated between 2010 and 2016 in Indonesia. They found that the growth ability in human cells significantly differed depending on the strains, although all of the tested viruses replicated efficiently in chicken cells.

The US team analyzed the pathogenicity in mice of H5N1 viruses isolated from Indonesian poultry and they found that the Clade 2.3.2.1 viruses showed higher pathogenicity than the Clade 2.1.3 viruses.

In summary, we have strengthened the influenza surveillance systems and collected swab samples in Indonesia. From these samples, we have isolated H5N1 viruses currently circulating in Indonesia and have molecularly and biologically characterized them. The information from this study improves our understanding of the current situation regarding H5N1 virus circulation in Indonesia.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. インドネシアにおける高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの解析、ポスター、今村剛朗、Sixth Negative Strand Virus-Japan. Okinawa, Japan、2017/1/16、国内.
2. Update of pandemic & H5N1 viruses in Indonesia、口頭、Chairul A. Nidom、Swiss-Indonesia Vaccine Formulation Symposium. Surabaya, Indonesia、2017/3/29、国外.
3. Construction of Indonesian-strain avian flu virus seed vaccine using low pathogenic hemagglutinin gene and neuraminidase PR8 gene through reverse genetic、口頭、Reviany V. Nidom, Ema Qurnianingsih, Kuncoro P. Santoso, Rahmalia D. Suindari, Ulvie A, Almira F. Lahay, Setyarina Indrasari, Kadek Rachmawati, Chairul A. Nidom、Swiss-Indonesia Vaccine Formulation Symposium. Surabaya, Indonesia. 2017/3/29、国外.
4. Growth optimization of H5N1 influenza vaccine seed strain Indonesia low pathogenic viruses by reverse genetic in MDCK cell. Swiss-Indonesia Vaccine Formulation Symposium、口頭、Ema Qurnianingsih, Kadek Rachmawati, Ira Humairah, Kuncoro P. Santoso, Rahmalia D. Suindari, Ulvie Apritasari, Reviany V. Nidom, Chairul A. Nidom. Swiss-Indonesia Vaccine Formulation Symposium、Surabaya, Indonesia. 2017/3/29、国外.
5. Mutation of H5N1 influenza viruses as a vaccine seed in a variety of hosts by the molecular studies of hemagglutinin and neuraminidase fragment、口頭、Kadek Rachmawati, Ema Qurnianingsih, Kuncoro P. Santoso, Rahmalia D. Suindari Ulvie Apritasari, Muh Y. Alamudi, Reviany V. Nidom, Chairul A. Nidom、Swiss-Indonesia Vaccine Formulation Symposium. Surabaya, Indonesia. 2017/3/29、国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし