

## Genetic and Virologic Characteristics of Recent H5 Subtype Avian Influenza Viruses in North America

### 近年の北米における H5 型トリインフルエンザウイルスの遺伝学的・ウイルス学的特徴

Chang-Won Lee[A], Dennis Senne[B], Jose Kinares[C], Peter Woolcock[D], David Swayne[A], and David Suarez[A]

[A] Southeast Poultry Research Laboratory, USDA-ARS, 934 College Station Road, Athens, GA 30605

[B] National Veterinary Services Laboratories, USDA-APHIS, P.O. Box 844, Ames, IA 50010

[C] Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, 1812 Water St., Box 84, Gonzales, TX 78629

[D] Fresno Laboratory, University of California, Davis, 2789 South Orange Ave, Fresno, CA 93725

#### 要約

H5 型は、米国で分離されるトリインフルエンザウイルス(AIV)亜型の中でもっとも多く、北米での 2 回にわたる高病原性 AI の流行に関係している。AI は米国の野生鳥類の間では蔓延しており、この保有動物から家禽へのウイルスの伝播は日常的に起こっている。しかし、鶏と七面鳥において H5 型 AIV が分離されることは稀である。2002 年に鶏と七面鳥において 2 つの異なる H5 型流行が発生した。最初の流行はテキサス州で起こったもので、H5N3 型 AIV が原因であることが突き止められた。2 つ目の流行は H5N2 型によるもので、これはカリフォルニアの七面鳥農場から分離された。HA、NA、M、NS 遺伝子の系統分析に基づくと、テキサスとカリフォルニアの分離株は野生鳥類から別個に導入されたものであると考えられる。その他の最近の H5 型分離株と比較すると、テキサス H5N3 型分離株は HA 遺伝子に独特の変化を多数有しており、その一つとして、HA 開裂部位の配列が REKR/G であった(その他の最近の分離株は典型的な無病原性モチーフである RETR/G を有する)。H5 型ウイルスの HA 開裂部位の配列には病原性発揮に最低限必要な数の塩基性アミノ酸が存在することがあるが、テキサス分離株は 12 位のアミノ酸部位(Asn 12)がグリコシル化しており、これがこのウイルスが高病原性になることを防いでいると考えられる。また、この分離株は NA 幹部の遺伝子には、鶏に適応したその他のインフルエンザウイルスの特徴であるアミノ酸 24 個の欠失があり、このことから、この分離株は分離されるかなり以前から家禽の間で循環していたものと考えられる。H5N3 型に対する血清陽性のデータが過去にあることも、この結論が支持される。実験研究では、鶏においてこのテキサス分離株が他の H5 型分離株よりも良好に複製することから、この分離株が鶏により適応していることが支持される。

## 序論

水鳥がインフルエンザウイルスの自然宿主かつ保有動物であると考えられている。野生のガンカモ類やシギチドリ類からは、15種類のヘマグルチニン型と9種類のノイラミニダーゼ型のすべてが分離されている。家禽はこのウイルスの自然宿主だとは考えられていないが、野生鳥類から家禽への伝播は日常的に発生している。家禽にはほとんどの HA 亜型が存在するが、家禽において高病原性トリインフルエンザを引き起こす分離株は H5 型と H7 型のみであるがはっきりしていることから、この2種類の亜型が特に重要である。

北米では、H5 型ウイルスが関与した高病原性トリインフルエンザ(HPAI)の流行が何度か起きている。1966 年には、H5 型の原型となるウイルスである A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9)によって限局的な流行が発生した。1983 年には、ペンシルベニア州のコマーシャル鶏に HPAI が流行し、家禽産業が打撃を受けた。生家禽市場(LBM)に由来する H5N2 型分離株を遡行的に遺伝子分析すると、コマーシャル用家禽の操業所での感染の源になっているのは LBM である可能性が強いという証拠が得られた。強化された監視調査によると、1986 年以降、生家禽市場の内外の鶏には H5N2 型ウイルスが散発的に持続していた。1990 年以降は、分離される H5 型の数が 1980 年代よりも減少した。それと時を同じくして、H7 型の AIV 分離株が増加していった。1993 年に生家禽市場の鶏から分離された H5N2 型ウイルスの一部は病原性を獲得する潜在能力を有することが示されたが、1990 年移行の分離株の大部分は、無病原性 H5 型ウイルスに類似した性質を有していた。1990 年以降は、鶏と七面鳥から H5 型の AIV が分離されることは非常に珍しくなり、家禽の鶏と七面鳥の発病を伴う流行の報告はない。

2002 年に、鶏と七面鳥において2種類の異なる H5 型の流行が発生した。1 つ目の流行はテキサスで起きたもので、原因ウイルスは H5N3 型 AIV であると同定された。2 つ目の流行では、カリフォルニアの七面鳥から H5N2 型ウイルスが分離された。本稿では、これら分離株の考えられる由来を判定し、それらを鶏および七面鳥には由来しない北米の H5 型ウイルスと比較した。さらに、鶏における最近の H5 型ウイルスの複製能力と病原性の強さを比較した。

## 材料と方法

**ウイルス** 本研究に用いたウイルス分離株は、米国農務省獣医サービス(アイオワ州エームズ)、テキサス州医学診断試験所(テキサス州ゴンザレス)、カリフォルニア州家畜衛生試食品安全試験所フレズノ支部(カリフォルニア州フレズノ)から入手した。ウイルスを発育鶏卵(ECE)で継代した後に、尿膜腔内に接種した。その分離株をサウスイースト家禽研究所でもう1、2回継代し、実験用のウイルスのストックにした。

**鶏における病原性** AIV を含む無細菌 AAF を 10 倍希釈して、その 0.2 ml を SPF 鶏群に由来する 6 ~ 8 週齢の鶏 8 羽に接種した。その鶏を接種後 10 日まで(10 DPI)、発病および死亡について観察した。

**14 日 齢 ECE での継代系** 2 種類 の H5N2 型 (A/Pheasant/NJ/1355/98 および

A/Avian/NY/31588-3/00)と、1種類の H5N3 型(A/CK/TX/167280-4/02)の分離株の 10 日齢 ECE における初代継代を親ウイルスとして用いた。これらウイルスを、HP の派生株に有利な 14 日齢の発育鶏卵実験系で継代した。

**RNA の抽出と配列決定** RNeasy キット(Qiagen、カリフォルニア州バレンシア)を利用して、ECE の感染尿膜腔液から本研究に用いた分離株の RNA を抽出した。Qiagen one-step キット(Qiagen)の標準的な RT-PCR とインフルエンザウイルスの各 RNA セグメントの終端に保存されている 12~13 個の塩基に対するプライマーを用いて、ヘマグルチニン、ノイラミダーゼ、基質、非構造遺伝子の全コード領域を増幅した。PCR 産物を、Qiagen ゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製した。配列決定は、PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing キット(Perkin-Elmer、カリフォルニア州フォスターシティ)を 373A 自動シーケンサー(Perkin-Elmer)上で走らせて行った。

**ヌクレオチドとアミノ酸配列の系統分析** ヌクレオチド配列の比較は、まず最初に、Clustal W アライメントアルゴリズムを用いた Megalign プログラム(DNASTAR、ウィスコンシン州マディソン)で行った。Megalign プログラムでペアワイズ配列アラインメントも実行し、ヌクレオチドとアミノ酸配列の類似性を判定した。各遺伝子セグメントのアラインメントした配列の系統発生的比較は、PAUP 4.0b4 ソフトウェア(Sinauer Associates, Inc, マサチューセッツ州サンダーランド)を利用した発見的探索によって、ブートストラップ反復を 100 とした最大節約法で行った。

**鶏への実験的感染** 3 種類の分離株のいずれか一つを、3 週齢の SPF ホワイトロック種の鶏 3 群(各群 10 羽)に経鼻的に接種した。3 および 7 DPI において、気管とクロアカの綿棒ぬぐいサンプルを採取した。この綿棒を、抗生物質を入れたブレインハートインフュージョン(BHI)ブロスに浸漬して、その浮遊液を 10 日齢の ECE に注入して、ウイルスの再分離と力価測定を行った。

## 結果

**ウイルスの分離** この 5 年間で、複数の H5N2 型ウイルスが LBM から分離された。これらのウイルスが分離されたのは、家禽アヒル、猟鳥、環境サンプルからであった。その他にも、監視調査の一環として LBM へ売ることが要求された鳥であるウズラ、キジ、アヒルからウイルスが分離された。カリフォルニアでは種七面鳥の凍結肺サンプルから H5N2 型が分離された。飼育群が AIV に対して血清陽性であることがすでに示されていた。H5N3 型流行が発生したテキサス州の養鶏場は、そこを所有している採卵業者はなかば退職して鶏(白色レグホン)を数羽飼育しているのみであり、一部の建造物を 2 つの LBM 経営者に貸与していた。その LBM 経営者らはその建造物を、弱ったブラウン系産卵鶏と弱ったプロイラー種鶏を保管するのに使用していた。2002 年 4 月に、白色レグホンにおいて喘鳴、頭部浮腫などの臨床徴候が現われ、111 羽のうち 16 羽が死亡した。これらの鶏と、さらには疾患の臨床徴候は現さなかったブラウン系産卵鶏からも、複数の H5N3 型ウイルスが分離された。1999 年には、コマーシャル用七面鳥農場 1 か所と、LBM 出荷予定のアヒル用の施設 2 か所において、H5N3 型感染を示す血清学的証拠が示さ

れた。

配列と系統分析 24 種類の H5 型分離株の HA1、NA、NS、M 遺伝子セグメントのコード配列を決定し、データベースに登録されているその他の配列と比較した。HA1 の系統樹によれば、七面鳥または鶏以外に由来する最近の H5 型分離株のすべてが近縁であり、これら分離株は Pennsylvania/83 系統とは明らかに異なることが示された。これら最近の分離株の中では、2 つに分かれたクラスターが見られた。一方のウイルスクラスターには、2001 年と 2002 年に得られた分離株のみが含まれていた。様々な NS 型を含む NA、MA、NS の系統樹も、同様の配置を示した。

HA、M、NS の配列に基づくと、カリフォルニアの七面鳥からの分離株は一つの系統のクラスターを形成していた。しかし N2 配列は独特であり、その他の最近の分離株のいずれともクラスターを作らなかった。

テキサス州の H5N3 型分離株は、1998 年に LBM 外の施設で得られた最近の分離株 (A/Environment/NY/5626-1/98) にきわめて近いクラスターを形成した (ヌクレオチド配列相同性が 93.2%)。テキサス分離株は、その他の最近の H5 型分離株に比べて、HA 遺伝子に数多くの独特の変化が見られ、その一つとして、HA 開裂部位の配列が REKR/G であった (その他の最近の分離株は RETR/G というモチーフ)。この分離株は 12 位のアミノ酸 (Asn 12) がグリコシル化していた。このテキサス H5N3 型分離株とその他の野生鳥類からの分離株の N3 遺伝子を分析してみると、近縁関係はないらしいことが分かった。また、テキサス分離株の NA 遺伝子には、幹部にアミノ酸 24 個の欠失があり、これはその他の野生鳥類分離株では見られなかった。

実験的に感染させた鶏における複製と病原性 3 種類のウイルス (A/Chicken/TX/167280-4/02、A/Turkey/CA/D0208651/02、A/Duck/ME/151895-7A/02) のうちいずれか 1 種を含んだ尿膜腔液 ( $10^{5.0}$  EID<sub>50</sub>) で、3 週齢の SPF 鶏を経鼻的に感染させた。七面鳥およびアヒルからの分離株では観察期間中に発病は見られなかった。しかしテキサス分離株に感染させた鶏は、3 DPI において元気消失し、感染後 6 日で 2 羽が死亡した。3 DPI と 7 DPI での気管から分離されたウイルスの力価は、七面鳥またはアヒル分離株で感染させた鶏に比べて、テキサス分離株で感染させた鶏のほうがはるかに高かった。テキサス分離株または七面鳥分離株で感染させた鶏のクロアカのぬぐいサンプルからは、ウイルスは分離されなかった。アヒル分離株で感染させた鶏のクロアカぬぐいサンプルからは非常に低力価のウイルスが回収された。

## 考察

LBM 内および LBM 外の施設における AIV 亜型の調査により、感染抑止の努力にもかかわらず H5 型が存続していることが明らかになった。この種の亜型のある系統は米国において HPAI 流行の原因になったことがあるため、このことは問題である。配列分析と動物実験の結果に基づくと、LBM 内外に由来する最近の H5N2 型ウイルスのすべてが一貫して低病原性 AIV である。系統分析によれば、一部の分

離株はともにクラスターを形成する傾向があったが、そうした分離株が家禽における汎流行的感染に該当するものなのか、それとも、野生鳥類からの別個の導入を表しているのかは不明である。このクラスター形成は、ウイルスが分離された年に同時に起こっており、遺伝子には家禽への適応の示す徴候が見られないことから、別個の導入である可能性の方が強い。

H5N2 型のウイルスとは異なり、テキサス H5N3 型ウイルスは開裂部位に複数の塩基性アミノ酸を有していた(R-E-K-R)。この HA 開裂部位の配列は、12 位アミノ酸(Asn 12)の開裂部位の近傍の炭水化物残基が失われると、病原性モチーフになりうる。したがって、点変異によって開裂部位近傍のグリコシル化部位が除去されて、HP ウイルスになった可能性がある。系統分析によれば、このテキサス分離株は北米のその他の H5 型分離株同様に、野生のガンカモ類に由来すると考えられるが、初めて分離された時よりもずっと前から長期間にわたって家禽の中で循環していた。この結論は、NA 幹部遺伝子に欠失があることと、H5N3 型に対する血清陽性が過去に観察されていることで支持される。最近の H5 型分離株の大半は低病原性であり、開裂部位の配列が典型的な無病原性のガンカモ類のものと同様であるが、テキサスでの流行と家禽農場および LBM との関係性は、北米における H5 型 AIV の監視調査と抑止作業の重要性を強く示している。