

# EVALUATION OF MOLECULAR MARKERS FOR PATHGENISITY IN RECENT H7N2 AVIAN INFLUENZA ISOLATES FROM THE NORTHEASTERN UNITED STATES

## 米国北東部由来の前の H7N2 型トリインフルエンザ分離株の病原性に関する分子マーカーの評価

Erica Soacj nab and David L. Suarez

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

### 要約

1994 年以降、北米の都市部の生家禽市場(LBM)からは常に、同地域の商業用家禽からは稀に、H7N2 型の低病原性トリインフルエンザウイルス(AIV)が分離される。LBM システムに AIV が 8 年間にわたって存続してきたことで、ウイルスは進化し、キジ目に適応して増殖できるようになってきた。これまでのところ、H5 または H7 型の低病原性 AIV が家禽に存続しているとそのウイルスから高病原性の型が出現するという結果になっており、ウイルスが初めて検出されてから数か月ないし 2、3 年以内にその出現が起こったこともあった。鶏と七面鳥に対する AIV の病原性には、ヘマグルチニン開裂部位のアミノ酸配列が強く関係しており、H7 型ではその配列に塩基性アミノ酸が 5 個以上あることが高病原性 AIV の分子的基準とされている。1994 年から 2002 年までの間にこの系統が関与した複数の流行から得た AIV 分離株 50 種類の開裂部位配列には 5 種類がある。もっとも早い 1994 年の分離株は 1999 年まで存続したが、塩基性アミノ酸は 2 個であった。1995 年と 1999～2002 年には、配列に塩基性アミノ酸が 3 個見られた。2002 年にはついに、開裂部位の配列に塩基性アミノ酸を 4 個持つウイルスが分離された。この 8 年間は開裂部位の塩基性アミノ酸が増える傾向にあり、塩基性アミノ酸が 5 個になると、高病原性ウイルスが出現する可能性が高い。

### 序論

1994 年以降ニューヨークとニュージャージーの生家禽市場(LBM)からは、H7N2 型のトリインフルエンザウイルス(AIV)が日常的に分離されている(6,7,10)。ウイルスはペンシルバニア(1997 - 1998、2001 - 2002)、バージニア(2002)、ノースカロライナ(2002)の商業農場に伝播し、その結果、ほんの数か所の施設にだけ広がった流行が、やがて 2002 年のバージニアにおける 200 近くの農場が巻き込まれた大流行にまで至った。そのウイルスは低病原性のままだったが、経済への影響は甚大であった。

LBM から AIV を根絶する試みがとられたが、わずかな成果しか得られなかった。その理由はおそらく、

抑止対策がコマーシャル用家禽に対するものほど厳密ではなく、LBM を持つ州同士の間で、モニター調査と抑止プログラムが統一されていなかったためである。

このウイルス系統は 8 年にわたって循環しているうちに、本来は AIV の宿主ではないキジ目の家禽に適應して増殖するようになり、それ自体が比較的安定した遺伝系統として確立した。しかし、複数の遺伝子で宿種特異的な変化がおそらく起き、病原性に影響する変化もあったものと思われる。特に、ヘマグルチニン(HA)たんぱく質の開裂部位が鶏と七面鳥における AIV 病原性のマーカーになることはよく知られている(1 で総説)。本稿では、近年の北米での H7N2 型 AIV の HA 開裂部位に起きた変化を追跡し、開裂部位の配列と病原性について現在行われている評価について述べる。

## 材料と方法

**ウイルス分離株** インフルエンザ分離株は国立動植物検査局獣医サービスの保存サンプルから得た。分離株はすべて、生家禽市場もしくは家禽農場の鳥(主に鶏と七面鳥)の気管もしくはクロアカのぬぐいサンプルから作成されたものか、生家禽市場と家禽農場の施設の環境ぬぐいサンプルから作成されたものである。AIV 分離株の作成は、以前の記載(9)に従って 9~11 日齢の特定病原体除去(SPF)発育鶏卵で行った。本稿で扱った AIV 分離株は全部で 50 種である。

**配列決定** 尿膜腔液(発育鶏卵で継代は 2 世代以下)からの RNA の分離は、Trizol Ls 試薬 (Life Technologies, メリーランド州ロックビル)を製造者の指示通りに用いて行った。HA 遺伝子分節の全コード領域を、Qiagen 一段階 RT-PCR(Qiagen Inc. カリフォルニア州バレンシア)キットで増幅した。その際には、以前に記載(11)した遺伝子分節の終端側のヌクレオチドを 12 から 13 個以上保存しているものをプライマーとした。RT-PCR 産生物を 1.2%寒天ゲル上で電気泳動し、Qiagengel 抽出キット(Qiagen)で抽出し、pAMPI ベクター(Gibco)にクローニングした。ABI PRISM BigDye Terminator 配列決定キット(Perkin-Elmer, カリフォルニア州フォスターシティ)によって配列を決定した。配列決定反応は PE 3700 自動シーケンサー (Perkin-Elmer)で行った。

**配列分析** 配列分析は Lasergene ソフトウェア (DNASar, ウィスコンシン州マディソン)で行った。多重配列アラインメントには ClustalV アルゴリズムを用いた。

## 結果

**ヘマグルチニン開裂部位の配列** 1994 年から 2002 年までの間で、ニューヨーク、ニュージャージー、マサチューセッツの LBM からと、ペンシルバニア、バージニア、ノースカロライナのコマーシャル用家禽から分離された H7 亜型 AIV 株には HA 開裂部位が 5 か所見られた。1994 年にもっとも早く分離された 3 種類の H7 型分離株と 1999 年に分離された 3 種類の H7N3 型ウイルスの配列は N-P-K-T-R /G であり、開裂部位の塩基性アミノ酸は 2 個(K または R)であった。1995 年と 1998 年にそれぞれ分離された株の配列は K-P-K-T-R G で、塩基性アミノ酸は 3 個であった。1995 年から 1999 年までの主流(16 分

離株)の配列では塩基性アミノ酸は2個のみであったが、-2位のアミノ酸がトレオニンからプロリンに変化していた(N-P-K-P-R /G)(最初の報告は Suarez, et al. (10))。1998年にはK-P-K-P-R /Gという配列を持つ分離株が出現した。この配列には塩基性アミノ酸が3個あり、これが1999年から現在(2002年中期まで)に至るまでのもっとも一般的な配列(全部で23分離株)になった。K-P-K-K-R /Gという塩基性アミノ酸を4個持つ配列が最初に見つかったのは2002年初頭であった。この配列をもつ分離株は本稿のものも含めて3種類が存在する。

-4位のプロリンのcodonはCCAであるので、アルギニンに変わるにはヌクレオチドが1個変化するだけでよい(CCA から CGA に)。しかし、リシンに置き換わるには最低でも2個が変化する必要がある(CCA から AAA または AGA に)。

## 考察

バイオセキュリティの緩さ、感受性を持つ宿主の絶え間ない流入、多様な種類の鳥類の日常的な混交のために、都市部のLBMはAIVにとって生息と進化のためのまたとない環境になっている。H7N2型の単一の系統が8年以上にわたってLBM体制のキジ目家禽の中に存続していた。家禽において過去に何度かあったH5およびH7型のAIV流行の中で、低病原性トリインフルエンザ(LPAI)ウイルスが、高病原性トリインフルエンザ(HPAI)に進化した(2,3,4,5)。

鶏と七面鳥におけるAIVの病原性の分子指標としてもっとも重要かつ特徴的なのは、HA開裂部位に塩基性アミノ酸が複数個存在することである。HA開裂部位に塩基性アミノ酸(リシンとアルギニン)が複数個あることで、HAはより広範囲な種類の組織で開裂できるようになる。感染するにはこのたんぱく質の開裂が必須であるので、そうなると全身感染が起こり、続いてHPAIとして発病する。それに対してLPAI感染は呼吸器と消化管に局所的に留まる(1で総説)。

1994年以降は、この系統に由来するH7型AIVのHA開裂部位の塩基性アミノ酸の数が2個から4個に増え、塩基性アミノ酸の数が増大する傾向を示した。塩基性アミノ酸4個が1999年以降主流を占めていた3個モチーフよりも有利に競合し、3個のものに置き換わって主流の座を占めるようになっていくのかが現時点では不明である。この点が重要である。

AIVの病原性の分子的基盤に関する現時点での知見によると、開裂部位の塩基性アミノ酸の、高病原性のH7型ウイルスが生み出されるのに最低限必要な数は5個であると考えられている(8)。ウイルスが長期にわたって流行し続けるならば、高病原性型のモチーフに一致する開裂部位がいずれは出現するだろうが、それがいつ起きるのかを予測することは不可能である。HA開裂部位に見られる現在の傾向は、生家禽市場からのAIV根絶の必要性をさらに強めるものでもある。