

学 位 論 文 要 旨

氏名 Ahmed Magdy Ahmed Khalil

題 目 : Insights into the evolution of influenza A viruses circulating in pigs and birds

(豚及び鳥類間で循環する A 型インフルエンザウイルスの進化に関する見識)

論文要旨 :

Human influenza viruses result in 250,000–500,000 deaths annually. In addition, the introduction of swIAVs and AIVs in human populations can result in insidious pandemics. For instance, the avian-origin H1N1 Spanish flu pandemic in 1918 and the swine-origin H1N1 pandemic in 2009 reported an estimated number of 50 million and 284,000 deaths, respectively. Therefore, investigating the ecology and evolution of swIAVs and AIVs in their primary hosts can help intervene in the occurrence of occasional pandemics.

Although the genetic evolution rate of swIAVs is considered lower than that of human influenza viruses, genetic diversity among HAs of A(H1N1)pdm09-related swIAVs isolated in Japan during 2013–2018 has been reported to be broader than that of their human counterparts. In Chapter I, a variation in the HA antigenicity of A(H1N1)pdm09-related swIAVs was revealed, and the genetic diversity associated with the antigenic difference of HA was demonstrated, which indicates various evolution patterns of A(H1N1)pdm09-related swIAVs in swine populations. Additionally, the antigenically different swIAVs evolved individually in each pig population, which is consistent with the fact that swIAVs are genetically and antigenically variable by region, even among strains of the same subtype. Overall, insights were provided into the variable evolution patterns of swIAVs, and the critical importance of continuous surveillance of swIAVs were highlighted as public health threats.

As part of our AIV surveillance activity on the Izumi plain, an overwintering site in Kagoshima prefecture, Japan, three AIVs of two subtypes were isolated: two AIVs of the H4N6 subtype and one AIV of the H3N8 subtype during the 2017/18 winter season (Chapter II). The three isolates were revealed to be genetic reassortants. The genetic constellation of these isolates, compared with their counterparts isolated during previous seasons in the Izumi plain, are not conserved throughout different seasons. The results

imply the role of wild birds in the genesis and spread of AIVs, and the importance of continuous AIV surveillance on the Izumi plain.

In the 2020/21 winter season, several outbreaks in wild and domestic birds were induced by H5N8 HPAIVs belonging to clade 2.3.4.4b in European and Asian countries. In addition, unprecedented spillover events of H5N8 HPAIVs were reported in humans in the Russian Federation during February 2021. In Chapter III, two H5N8 HPAIVs were isolated from the feces of a falcated duck, *Anas falcata*, and environmental water samples were collected from the Izumi plain during the 2020/21 winter season. The falcated duck was also identified as a potential source of water contamination in the Izumi plain by genetic characterization of both isolates. This is the first report of H5N8 HPAIV isolation from a falcated duck in Japan, particularly because they are minor host species for AIVs compared with mallards, northern pintails, and Eurasian wigeons. These results imply the role of wild birds in the dissemination of H5N8 HPAIVs during the 2020/21 winter season in Japan.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Ahmed Magdy Ahmed Khalil
審査委員	主 査： 鹿児島大学 准教授 小澤 真
	副 査： 鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副 査： 鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副 査： 鹿児島大学 教授 白石 光也
	副 査： 鳥取大学 准教授 笛吹 達史
題 目	Insights into the evolution of influenza A viruses circulating in pigs and birds (豚及び鳥類間で循環する A 型インフルエンザウイルスの進化に関する見識)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>A 型インフルエンザウイルスは、野生の水禽類、とりわけカモ類を自然宿主としながら、ニワトリなどの家禽を含む多様な鳥類のほか、ヒト、ブタ、ウマ、イヌなどの哺乳類にも感染して健康被害を引き起こす。同ウイルスのゲノムは 8 分節のマイナス鎖 RNA により構成され、高頻度の遺伝子変異ならびに遺伝子再集合によって加速度的に進化する。</p> <p>ブタは、鳥類を含む様々な動物種に由来する A 型インフルエンザウイルスに対して感受性を示すため、遺伝子再集合を通じて新たな遺伝的特性を備えたウイルスを生じやすい。実際、2009 年にヒト社会でパンデミックを引き起こした A(H1N1)pdm09 ウイルスは、もともとブタ集団内で流行していたウイルスを起源とする。このウイルスは 2009 年以降、季節性インフルエンザウイルスとしてヒト社会に定着しているが、同系統のウイルスはブタ集団内における流行も確認されている。ウイルス粒子表面に発現するヘマグルチニン (HA) は中和抗体との反応性に重要な役割を果たすが、このウイルス蛋白質をコードする HA 遺伝子に関するこれまでの研究の中で、ブタ由来の A(H1N1)pdm09 ウイルスはヒト由来ウイルスよりも高い遺伝的多様性が示されている。その一方で、ブタ由来ウイルスの HA 抗原性に関する知見は乏しく、遺伝的多様性との関連性も明らかではない。第 1 章において申請者は、2009 年のパンデミック初期に分離されたヒト由来ウイルス株と、これを抗原として調整したフェレット抗血清ならびにマウスモノクローナル抗体 20 クローンを用いて、国内 12 農場の飼養豚から分離されたウイルス株の HA 抗原性を解析した。12 株中 5 株に対するフェレット抗血清の中和抗体価は、パンデミック初期分離株に対する中和抗体価の 1/8 と低く、これら 5 株の HA 抗原性はヒト流行株と優位に異なることが示された。また、全 12 株のマウスモノクローナル抗体との反応パターンはいずれも一致しなかったことから、各農場において特有の HA 抗原性を備えたウイルスが流行</p>	

していることが示された。さらに申請者は、プラスミドを用いた A 型インフルエンザウイルスの人工合成技術を用いて、HA の抗原決定部位に特定のアミノ酸変異を有する 6 種類のウイルス変異体を作成し、フェレット抗血清およびマウスモノクローナル抗体との反応性を検証した。その結果、190 番目のアミノ酸をセリン残基からアルギニン残基へ置換したウイルス変異体に対する中和抗体価は、パンデミック初期分離株に対する中和抗体価の 1/8 だった。そのため当該アミノ酸変異は、A(H1N1)pdm09 ウイルスの HA 抗原性を大きく変化させることが示された。これらの研究成果は、ブタ集団内における A(H1N1)pdm09 ウイルスの進化を理解する上で重要な新知見として、ウイルス学専門誌 *Journal of General Virology* 上で公表された。

野生の水禽類から分離される A 型インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子表面に発現する 2 種類のウイルス蛋白質 HA およびノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の差異によって、16 種類の HA 亜型と 9 種類の NA 亜型に分類される。さらに各 HA および NA 亜型は、分子系統学的に区別される複数の遺伝子系統に細分化される。また、他のウイルス蛋白質をコードする 6 遺伝子についても、複数の遺伝子系統に分類される。鹿児島県出水平野では、1 万羽を超える絶滅危惧種のツル類のほか、より多くの羽数のカモ類が越冬する。同地では、環境水や野鳥の糞便などから様々な亜型の鳥インフルエンザウイルスが毎年のように分離されてきた。中でも H3N8 亜型ウイルスは 2012-13、2016-17、および 2017-18 年シーズンに、H4N6 亜型ウイルスは 2012-13、2013-14、および 2017-18 年シーズンに、それぞれ分離されてきた。第 2 章において申請者は、各シーズンに分離された両亜型ウイルス株の全遺伝子分節を分子系統学的に解析し、同地における両亜型ウイルスの遺伝的多様性や遺伝子構成の変遷を明らかにした。これらの研究成果は、野鳥集団内で流行する A 型インフルエンザウイルスの進化を理解する上で重要な新知見として、ウイルス学専門誌 *Archives of Virology* 上で公表された。

2020-21 年シーズンには、全国の野鳥や家禽で H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが流行した。鹿児島県出水平野においても、環境水や野鳥の糞便などから同亜型ウイルスが相次いで分離された。第 3 章において申請者は、2020 年 11 月 5 日に回収された野鳥糞便、ならびに同年 11 月 9 日に採取された環境水から同亜型ウイルスを分離し、両ウイルスが遺伝子レベルでほぼ同一であることを示した。また、ミトコンドリア DNA の遺伝子解析に基づいた動物種判別により、ウイルスが分離された野鳥糞便がヨシガモに由来することを明らかにし、同亜型ウイルスの地域レベルの伝搬にヨシガモが関与していることを示した。これらの研究成果は、野鳥集団内における A 型インフルエンザウイルスの伝播様式を示す重要な新知見として、微生物学専門誌 *Pathogens* 上で公表された。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文に相応しい質と量を備えているものと判定された。