

3. 最近日本で分離された鳥インフルエンザウイルス

真瀬 昌司¹, 河岡 義裕²

¹ 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所 感染症研究部

² 東京大学医科学研究所ウイルス感染分野

現在、アジアを中心に H5N1 亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザが猛威を奮っており、ヨーロッパへも広がる傾向をみせている。2004 年のわが国の 3 県における発生から分離されたウイルスは 2003 年中国で分離された遺伝子型 V に相当し、アジアで優勢な遺伝子型 (Z) とは異なっていた。また 2003 年の動物検疫所におけるウイルスサーベイランスで中国由来輸入アヒル肉からも高病原性 H5N1 亜型ウイルスが分離された。このウイルスは既知の遺伝子型とは異なっており、またウイルスのマウスに対する病原性はマウス接種後著しく増強した。

1. はじめに

2003 年以来 H5N1 亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザがアジア各国を中心に流行し、ヨーロッパ諸国へも拡散の兆候を見せている^{5,32,36,37,39,41,42}。また、2005 年 11 月現在までにカンボジア、ベトナム、タイ、インドネシア、中国で本ウイルス感染による死者が報告されている^{41,42}。

日本では 2004 年に山口、大分、京都の 3 県で発生が認められたが、関係者の努力により幸いにも以後の発生は認められておらずほぼ撲滅に成功したと考えられる。しかし周辺諸国における流行は再侵入の可能性を否定できない。本稿では昨年の発生の状況を改めて振り返るとともに日本で分離された他の H5N1, H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスについて著者らの得た知見を中心に紹介する。

2. 2004 年日本で発生した H5N1 亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザ

2004 年 1 月、山口県の採卵養鶏場にて H5N1 亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザが発生した^{22,29}。わが国における高病原性鳥インフルエンザの発生は 1925 年の H7N7 亜型ウイルスによる発生から 79 年ぶりであったが、H5N1 亜型ウイルスによるものはこれが初めてであった。隣国の韓国では、日本における発生の約 1 ヶ月前に高病原性鳥インフルエンザが確認され¹⁴、警戒を強めていた矢先の出来事であった。その 1 ヶ月後、大分県でペットとして飼われていたチャボでも発生がみられ、さらに京都府における大型採卵養鶏場にも発生し、その通報が遅れたため 2 次感染と思われる事例も確認された。また近郊のカラスから H5N1 亜型ウイルスが分離されるに至り、野鳥類への拡がりも懸念された²²。一方、ベトナムやタイ、インドネシアなどの東南アジア諸国でもすでに 2003 年から、H5N1 亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザが幅広く流行していたことが明らかとなり、さらに中国やラオス、カンボジア等でも発生が報告され、ヒトへの感染・死亡例が確認されるに至り、養鶏産業のみならず公衆衛生的にも大きな社会問題となっていた。このような状況下でわが国でも発生が認められたことから、ウイルスの性状解明に注目が集まった。そこで 3 県 (山口、大分、京都) 下における鶏の発生例から分離された H5N1 亜型ウイルス株の病原性試験、遺伝学的解析を実施した²²。

連絡先

〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
動物衛生研究所 感染症研究部
TEL : + 81-29-838-7764
FAX : + 81-29-838-7760
E-mail : masema@affrc.go.jp.

表1 アジアで分離された主な H5N1 亜型ウイルスの開裂部位アミノ酸配列

Viruses	Connecting peptide amino acid sequence							
A/chicken/Yamaguchi/7/2004	R	E	-	R	R	K	K	R
A/chicken/Oita/8/2004	R	E	-	K	R	K	K	R
A/chicken/Kyoto/3/2004	R	E	-	R	R	K	K	R
A/crow/Kyoto/53/2004	R	E	-	R	R	K	K	R
A/crow/Osaka/102/2004	R	E	-	R	R	K	K	R
A/HongKong/156/97	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Hong Kong/YU822.2/2001	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Hong Kong/YU562/2001	R	E	R	R	R	K	K	R
A/pheasant/Hong Kong/FY155/2001	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Hong Kong/FY150/2001	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Hong Kong/NT873.3/2001	R	E	I	R	R	K	K	R
A/duck/Hong Kong/573.4/2001	R	E	-	R	R	K	K	R
A/duck/AVL-1/Anyang/2001	R	E	R	R	R	K	K	R
A/teal/China/2978.1/2001	R	E	I	R	R	K	K	R
A/pheasant/Hong Kong/sv674.15/2002	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Hong Kong/96.1/2002	R	E	R	R	R	K	K	R
A/Hong Kong/213/2003	R	E	R	R	R	K	K	R
A/duck/China/E319-2/2003	R	E	-	R	R	R	K	R
A/chicken/Shantou/4231/2003	R	E	R	R	R	K	K	R
A/chicken/Indonesia/BL/2003	R	E	R	R	R	K	K	R
A/Vietnam/1196/2004	R	E	R	R	R	K	K	R
A/goose/Thailand/79/2004	R	E	R	R	R	K	K	R

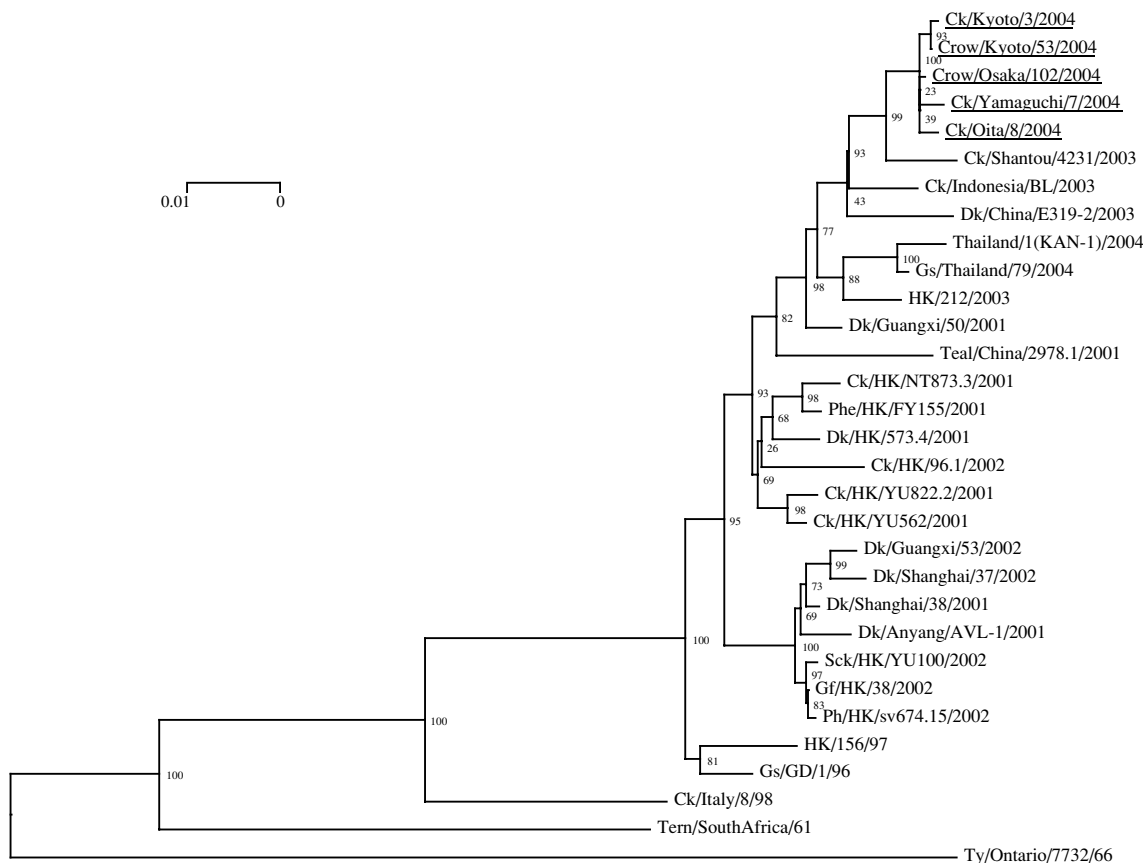


図1 H5 遺伝子の分子系統樹

表2 日本と韓国で分離された H5N1 亜型ウイルス株の比較

Segment	% Homology with Ck/Korea/ES/03		
	Ck/Yama/7/04	Ck/Oita/8/04	Ck/Kyoto/3/04
	Nucleotides (Amino acids)	Nucleotides (Amino acids)	Nucleotides (Amino acids)
PB2	99.7 (99.9; *N740D)	99.7 (99.9; N740D)	99.7 (99.7; *I463V, N740D)
PB1	99.8 (99.7; S80C, V171M)	99.6 (99.7; F94Y, V171M)	99.9 (99.9; V171M)
PA	99.7 (99.3; T54I, S254N, Y452H, I596V, L645V)	99.6 (99.3; T54I, G66D, S254N, Y452H, L645V)	99.5 (99.4; T54I, S254N, Y452H, L645V)
HA	99.5 (99.3; P86S, V219I, K325R, F545L)	99.6 (99.3; A83V, P86S, S503N, F545L)	99.6 (99.3; P86S, K152T, K325R, F545L)
NP	99.7 (99.8; N240D)	99.8 (99.8; N240D)	99.8 (99.8; N240D)
NA	99.6 (99.8; K45Q)	99.8 (100)	99.6 (99.6; K45Q, N289D)
M	99.9 (M1 100) (M2 100)	99.9 (M1 100) (M2 100)	99.8 (M1 100) (M2 100)
NS	99.4 (NS1 99.1; P3L, S212N) (NS2 96.7; P3L, Y55F, V60I, T90A)	99.5 (NS1 99.6; S212N) (NS2 98.3; Y55F, V60I)	99.5 (NS1 99.1; S73P, S212N) (NS2 98.3; Y55F, V60I)

*異なるアミノ酸の位置を示す

表3 山口県鶏発生例から分離されたウイルス (遺伝子型 V) と遺伝子型 Z の比較

Segment	% nucleotide (amino acid) homology with A/chicken/Yamaguchi/7/2004		
	A/chicken/Shantou/4231/2003	A/goose/Thailand/79/2004	A/HongKong/212/2003
	(genotype V)	(genotype Z)	(genotype Z+)
PB2	99.2 (98.9)	98.9 (99.6)	98.9 (99.3)
PB1	99.3 (99.6)	98.5 (99.3)	99.1 (99.6)
PA	99.6 (99.2)	93.6 (97.9)	93.8 (97.8)
HA	98.5 (98.1)	97.2 (97.0)	97.3 (97.3)
NP	99.5 (99.1)	98.7 (100)	99.1 (99.8)
NA	98.8 (98.4)	97.3 (96.4)	89.8 (92.1)
M	99.4 (M1 99.6) (M2 100)	98.8 (M1 99.6) (M2 96.9)	98.9 (M1 100) (M2 96.9)
NS	99.3 (NS1 97.8) (NS2 96.7)	98.2 (NS1 97.3) (NS2 98.3)	98.5 (NS1 98.2) (NS2 97.5)

その結果、わが国で分離されたウイルス株はいずれも HA 蛋白の開裂部位に塩基性アミノ酸 (K; リジン, R; アルギニン) の連続したペアが認められる典型的な高病原性ウイルスのものであり (表 1), 近年アジアで流行している H5 遺伝子の系統に属していた (図 1). またヒトの抗インフルエンザ治療薬として使用されているアマンタジンやオセルタミビルに対する感受性関連のアミノ酸を調べたところ, 耐性を示すようなアミノ変異は認められなかった²²⁾.

分子疫学的にわが国で分離されたウイルス株の近縁株を検索したところ, 韓国の鶏発生例から分離されたウイルスと全分節で 99% 以上の相同性を示したことから, 韓国と日本の流行は類似した株の流行に起因したと考えられ (表 2)²³⁾,

またこれらは中国広東省で 2003 年分離された遺伝子型 (genotype V) に分類されたウイルス株 (A/chicken/Shantou/4231/2003)¹⁶⁾ と高い相同性を示した. 一方, タイやベトナムで流行したウイルスは genotype Z に属するもので, 日本や韓国で流行したウイルス株とは異なっていた (表 3). この違いがヒトへの感染・致死性に関係していたのか否かは不明だが, 2003 ~ 2004 年のアジアにおける H5N1 の流行は複数の遺伝子型に起因していた^{16,37)}. この遺伝子型 Z のウイルスは中国青海省で死亡した水鳥からも分離されている^{3,20)} ことから広範囲な地域へのウイルスの拡散が懸念されている.

日本の 3 県の発生例から分離されたウイルスの鶏に対す

表4 アヒル肉から分離された H5N1 亜型ウイルス (A/duck/Yokohama/aq10/2003) の遺伝子解析

Segment	Number of nucleotides examined	Viruses with the highest homology a	% homology
PB2	2280	A/chicken/Netherlands/1/2003 (H7N7)	96.9
PB1	2274	A/duck/Zhejiang/52/2000 (H5N1)	98.8
PA	2151	A/chicken/Shantou/4231/2004 (H5N1)	97.5
HA	1707	A/chicken/Jilin/9/2004 (H5N1)	97.0
NP	1497	A/aquatic bird/Hong Kong/399/99 (H3N8)	97.2
NA	1410	A/egret/Hong Kong/757.2/2003 (H5N1)	98.9
M	982	A/goose/Hong Kong/3014.8/2000 (H5N1)	99.1
NS	823	A/duck/Hong Kong/380.5/2001 (H5N1)	98.9

る病原性試験を国際獣疫事務局 (World Organization for Animal Health; OIE) の方法に従い、鶏静脈内接種試験を行ったところ、接種した鶏を1日以内に死亡せしめる非常に病原性の高い株であることが判明し²²⁾、前述のHA蛋白の開裂部位アミノ酸配列から推測される病原性に一致した。一方、H5N1 亜型ウイルスはほ乳類へも感染・致死せしめることもあることからマウスを用いて山口県発生例から分離されたウイルスを代表株としてその病原性を評価した。その結果、50% マウス致死量は $5 \times 10^5 \text{EID}_{50}$ であり、これまで調べられてきた H5N1 ウイルス^{2,19)} の中では中程度であった。

3. 輸入検疫で分離された H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス

海外から輸入されたアヒル肉から H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが分離されることがある⁴⁰⁾。2003年5月中国から日本へ輸入されたアヒル肉から動物検疫所のウイルス検査で H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスが分離された。このウイルスの遺伝子型を調べたところ、既知の型とは異なるユニークなものであった(表4)²⁴⁾。またモノクローナル抗体を用いたHA蛋白の抗原解析の結果、既存株の反応性とは異なっていた²⁴⁾。このことは多様な遺伝子型、抗原性を有する H5N1 亜型ウイルスが幅広く流行している可能性を示唆しており、最近にも新たな遺伝子型の H5N1 亜型ウイルスが見いだされた¹³⁾ ことは、継続的な疫学調査が重要であることを示している。

このアヒル肉から分離されたウイルスの鶏に対する病原性を前述の OIE の方法で調べたところ、接種した鶏を全羽死亡せしめる高病原性であったが、その致死時間は日本の山口県発生例から分離されたウイルスのそれよりも若干長かった^{22,24)}。また鶏での自然感染ルートである経鼻接種法でこれらのウイルスの平均発症時間や平均致死時間、同居

伝播性を調べたところ差が認められた²⁵⁾。この結果、H5N1 亜型ウイルス株間でも鶏病原性に多様性があることが示唆された。現在アジアで優勢な遺伝子型 Z ウイルスについても比較検討することは防疫対策上重要と思われる。

またマウスに対する病原性を同様に評価したところ、50% マウス致死量は $5 \times 10^6 \text{EID}_{50}$ であり、高くなかった。しかし 10^6EID_{50} をマウスに接種後、2週間観察していたところ接種11日後2匹のマウスが死亡した。H5N1 亜型ウイルスのマウス病原性はマウス接種で容易に変異することが示唆されていたことから¹⁹⁾、これらの死亡マウス脳からウイルスを回収し、各50% マウス致死量を求めたところ、 10^2EID_{50} と元株に比べ著しく上昇していた。また元株とマウス脳由来変異株を遺伝的に比較したところ、1株はPB2タンパク質の627番目のアミノ酸がGluからLysに変異していた²⁴⁾。この変異は1997年の香港でヒトから分離された H5N1 ウイルスにおいて見いだされた病原性の相違に一致しており¹¹⁾、このPB2蛋白質の627番目のアミノ酸がLysであることがほ乳類に対する病原性に大きな影響を与えていることを示している⁷⁾。しかし残りの1株はこの変異は認められず、マウスに対する病原性には他の遺伝子も関与している可能性が示唆された²⁴⁾。

4. H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルス

中国から輸入されたアヒル肉以外にも、鶏肉材料から高病原性ではないが H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスが分離されている⁶⁾。弱毒ウイルスの感染といえども他の病原体との複合感染によりその病態が複雑化することが野外感染例や実験感染例で示されている^{12,28,33)}。中国において H9N2 亜型ウイルスは幅広く流行しており¹⁰⁾、H5N1 亜型ウイルスと同様多様な遺伝子型のウイルスが確認されている^{4,15,17)}。この H9N2 亜型ウイルスは1997-98年にパキスタンから輸入された愛玩鳥 (ワカケホンセイインコ；

Psittacula Krameri manilleusis) からも分離されており、これらは1999年に香港でヒトから分離されたウイルス^{9,18,34)}と遺伝的に極めて近縁であった²⁶⁾ことは輸入愛玩鳥の輸出入を介してもウイルスが容易に拡散される可能性を示す。このように輸入家禽肉や愛玩鳥のウイルスサーベイランスも鳥インフルエンザの防疫対策上重要と考えられる。

5. おわりに

2005年11月現在、H5N1亜型ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザは日本では発生していないが、東南アジアを中心に猛威を振るっているのみならずトルコやルーマニアでもウイルスが分離される⁴¹⁾などヨーロッパ諸国に拡散する傾向にあり、収束する気配をみせていない。このH5N1亜型ウイルスは鳥に対して高い致死率を示すのみならずヒトに対しても高い死亡率を示しており、ほ乳類に対する病原性も高いようである^{8,21)}。未だヒトからヒトへ効率よく伝播するには至っていないようであるが、いつその性質を獲得するか分からない。

一方、日本では2005年茨城県の養鶏場に弱毒のH5N2亜型ウイルスによる流行が続いている。分離されたウイルスは遺伝的に中南米で流行しているウイルスに近縁のようであり、その感染経路は現在のところ不明のままである。また同様に弱毒ではあるがアジアではH9N2亜型ウイルスも幅広く流行し、この中にはヒト型受容体に対する親和性を獲得しているウイルス株も存在する^{27,35)}。また2003年には香港で再びH9N2亜型ウイルスのヒトへの感染が報告されている¹⁾。このようにヒトに対する新型インフルエンザの候補としてH9N2亜型ウイルスに対する警戒も怠ることはできない。鳥インフルエンザ全般における継続的な疫学調査やワクチン開発^{30,31,38)}が重要と考えられる。

文 献

- Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, Lim W, Webster RG, Yuen KY, Peiris JS, Guan Y: Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol.* 43: 5760-7, 2005.
- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K: The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 10452-7, 2004.
- Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y: Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature.* 436: 191-2, 2005.
- Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, Butt C, Leung YH, Guan Y: Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J Virol.* 78: 8609-14, 2004.
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathai C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG: Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol.* 79: 10821-5, 2005.
- 衛藤真理子, 真瀬昌司: 中国産輸入鶏肉からのニューカッスル病ウイルスおよびH9N2インフルエンザウイルスの分離 *日本獣医師会雑誌* 56: 333-9, 2003.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD: Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1356-61, 2004.
- Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TD, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E: Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol.* 79: 2191-8, 2005.
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG: Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 9363-7, 1999.
- Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, Norwood M, Shortridge KF, Webster RG, Guan Y: Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology.* 267: 279-88, 2000.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y: Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, 1840-2, 2001.
- Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H: Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch Virol.* 149: 2095-104, 2004.
- Kou Z, Lei FM, Yu J, Fan ZJ, Yin ZH, Jia CX, Xiong KJ, Sun YH, Zhang XW, Wu XM, Gao XB, Li TX: New Genotype of Avian Influenza H5N1 Viruses Isolated from Tree Sparrows in China. *J Virol.* 79: 15460-6, 2005.
- Lee CW, Suarez DL, Tumpey TM, Sung HW, Kwon YK, Lee YJ, Choi JG, Joh SJ, Kim MC, Lee EK, Park JM, Lu X, Katz JM, Spackman E, Swayne DE, Kim JH: Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *J Virol.* 79: 3692-702, 2005.
- Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H: Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology.* 340: 70-83, 2005.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS: Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 430: 209-13, 2004.

- 17) Li KS, Xu KM, Peiris JS, Poon LL, Yu KZ, Yuen KY, Shortridge KF, Webster RG, Guan Y: Characterization of H9N2 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J Virol.* 77: 6988-94, 2003.
- 18) Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N, Hay A: Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 9654-8, 2000.
- 19) Lipatov AS, Krauss S, Guan Y, Peiris M, Rehg JE, Perez DR, Webster RG: Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. *J Virol.* 77: 3816-23, 2003.
- 20) Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF: Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science.* 309: 1206, 2005.
- 21) Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, Tumpey TM: Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol.* 79: 11788-800, 2005.
- 22) Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S: Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology.* 332: 167-76, 2005.
- 23) Mase M, Kim JH, Lee YJ, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Yamaguchi S: Genetic comparison of H5N1 influenza A viruses isolated from chickens in Japan and Korea. *Microbiol Immunol.* 49: 871-4, 2005.
- 24) Mase M, Eto M, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S: Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. *Virology.* 339: 101-9, 2005.
- 25) Mase M, Imada T, Nakamura K, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Yamaguchi S: Experimental assessment of the pathogenicity of H5N1 influenza A viruses isolated in Japan. *Avian Dis* 49: 582-4, 2005.
- 26) Mase M, Imada T, Etoh M, Sanada N, Tsukamoto K, Kawaoka Y, Yamaguchi S: Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J Virol.* 75: 3490-4, 2001.
- 27) Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG: H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology.* 281: 156-62, 2001.
- 28) Naeem K, Ullah A, Manvell RJ, Alexander DJ: Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Vet Rec.* 145: 560, 1999.
- 29) Nakatani H, Nakamura K, Yamamoto Y, Yamada M, Yamamoto Y: Epidemiology, pathology, and immunohistochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. *Avian Dis.* 49: 436-41, 2005.
- 30) Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y: An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 16825-9, 2005.
- 31) Neumann G, Kawaoka Y: Reverse genetics of influenza virus. *Virology.* 287: 243-50, 2001.
- 32) Nguyen DC, Uyeki TM, Jadhao S, Maines T, Shaw M, Matsuoka Y, Smith C, Rowe T, Lu X, Hall H, Xu X, Balish A, Klimov A, Tumpey TM, Swayne DE, Huynh LP, Nghiem HK, Nguyen HH, Hoang LT, Cox NJ, Katz JM: Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001. *J Virol.* 79: 4201-12, 2005.
- 33) Nili H, Asasi K: Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol.* 31: 247-52, 2002.
- 34) Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF: Human infection with influenza H9N2. *Lancet.* 354: 916-7, 1999.
- 35) Saito T, Lim W, Suzuki T, Suzuki Y, Kida H, Nishimura SI, Tashiro M: Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. *Vaccine.* 20: 125-33, 2001.
- 36) Shinya K, Hatta M, Yamada S, Takada A, Watanabe S, Halfmann P, Horimoto T, Neumann G, Kim JH, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kiso M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y: Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *J Virol.* 79: 9926-32, 2005.
- 37) The World Organization Global Influenza Program Surveillance Network: Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis.* 11: 1515-21, 2005.
- 38) Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H: Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology.* 341: 153-62, 2005.
- 39) Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultsz C, Cheng P, Lim W, Horby P, Farrar J; World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team: Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med.* 350: 1179-88, 2004.
- 40) Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee JG, Lee YJ, Mo IP, Sung HW, Swayne DE: Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J Virol.* 76: 6344-55, 2002.
- 41) World Health Organization: Weekly epidemiol. Rec. 80: 377-88, 2005.
- 42) World Health Organization: Weekly epidemiol. Rec. 80: 409-16, 2005.

Avian Influenza Viruses isolated in Japan

Masaji MASE¹ and Yoshihiro KAWAOKA²

¹Department of Infectious Diseases, National Institute of Animal Health
3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

²Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology,
Institute of Medical Science. The University of Tokyo 108-8639, Japan

E-mail: masema@affrc.go.jp.

E-mail: kawaoka@ims.u-tokyo.ac.jp

Currently, H5N1 influenza viruses remain a serious public health concern in Asia and now in Europe. We showed that the H5N1 viruses associated with outbreaks of HPAI in chickens in Japan were genotypically closely related to an H5N1 virus isolated from a chicken in China in 2003 (genotype V), but were different from those prevalent in southeastern Asia in 2003-2004 (i.e., genotype Z). H5N1 viruses were also isolated from duck meat imported from China during this routine surveillance in May of 2003. We characterized these H5N1 isolates and found that poultry products contaminated with influenza viruses of high pathogenic potential to mammals are a threat to public health even in countries where the virus is not enzootic and represent a possible source of influenza outbreaks in poultry.