

活化全粒子 (A/PR/8/34)と比較して、IFN- α の産生ピークが遅延し、ピーク時の IFN- α 産生量が増加することが明らかとなった。

D. 考察

抗体産生応答では、ワクチン接種後2週間程度をピークとする免疫初期の抗体産生に続いて、長期持続型の抗体産生へと移行する。本研究で得られた結果から、ワクチン接種後に誘導される IFN- α は、免疫初期の抗体産生の始動に必要であることが明らかとなった。

H5N1 型の不活化全粒子によりマウス脾臓細胞を刺激したところ、IFN- α が高濃度で産生されることが判明した。さらに HA と NA 以外は同一の分子から構成される H1N1 型不活化全粒子での刺激と比べ、産生ピークの遅延と、ピーク時の産生量の増加が観察された。この結果は HA、NA のサブタイプ間の構造の違いが IFN- α 産生に影響を与える可能性を示唆する。

これまで H5N1 型の強毒性ウイルスをヒトマクロファージや肺胞、気管支上皮細胞に感染させると、弱毒性ウイルスと比較して炎症性サイトカインがより強く産生誘導されることが報告されている。さらにこの活性はウイルスの不活化操作により損なわれることから、ウイルス複製過程の差を反映したものと推察されてきた。しかし、本研究において認められた不活化ウイルスによる IFN- α の産生とサブタイプ間での差は、ウイルス感染と増殖性に関連せず Toll-like receptor 等を介した自然免疫の活性様式の差に起因するものと推察される。

IFN- α は主に樹状細胞サブセットから産生され、この樹状細胞は脾臓のみならず骨髄や末梢血などにも存在し、その反応性が組織毎に若干異なる可能性も推察されている。そのため、in vivo に H5N1 型不活化全粒子を投与した場合、同様な IFN- α 産生パターンの変化が観察されるか否か、今後検討する必要がある。

E. 結論

インフルエンザ不活化全粒子ワクチンの接種により誘導される IFN- α は抗体産生惹起に必要であることを明らかにした。さらに、H5N1 型不活化全粒子は、他のサブタイプのものとは比べ IFN- α 産生誘導能が異なる可能性が示唆された。以上より、H5N1 型不活化全粒子ワクチンで観察される抗体産生惹起能の低下には、IFN- α 産生誘導能の差が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Yokota-Tsunetsugu, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S.-I., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58:88-94, 2005
- (2) Inamine, A., Takahashi, Y., Tokuhisa, T., Miyae K., Takemori, T. and Abe, R. Two waves of memory B cell generation in the primary immune response. *Int. Immunol.* 17:581-589, 2005
- (3) Takahashi, Y., Inamine A., Hashimoto, S.-I., Yoshioka, E., Kojima, N., Abe, R. and Takemori T. A unique role of Ras in memory B cell response. *Immunity* 23:127-138, 2005
- (4) Honnma, K., Udonon, H., Ohkusu-Tsukada, K., Khono, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T. Kumatori, A., Suzuki, S.,

Matsuyama, T. and Yui, K. Interferon regulatory factor-4 negatively regulates the product of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:16001-16006, 2005

- (5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori T. Serological diagnosis for SARS Corona virus. *Review Medical Virology in press*

1. 学会発表

[国際学会発表]

- (1) Takemori, T. "Ras is essential for memory B cell survival (招待講演)" 15th Germinal centre conference Potsdam, Germany, April, 2005
- (2) Takemori, T. "Unique role of the Ras in memory B cell response (招待講演)" Symposium on regulation of immune diversity and surveillance. Kyoto, March, 2005

[国内学会発表]

(第35回日本免疫学会総会、横浜、2005年12月)

- (1) Takemori, T., Takahashi, Y., Kaji, T., Hashimoto, S.-I., and Kuraoka, M. "Memory B cells express a set of unique genes, associated with anti-apoptotic activity" (Symposia: from germinal center to memory: affinity selection and cell fate decisions) (シンポジスト：口演)
- (2) 加地友弘、高橋宜聖、竹森利忠 「Survival of motor neuron(SMN)蛋白質による抗酸化作用抵抗性の賦与」(口演)
- (3) 高橋宜聖、加地友弘、稲嶺絢子、橋本修一、広瀬幸子、竹森利忠 「マウス記憶 B 細胞に発現増強するアポトーシス抑制分子の作用機序」(口演)
- (4) 窪田真澄、高橋宜聖、竹森利忠、大西和夫 「B 細胞分化の過程で発現する BILL-cadherin は二次免疫応答における抗体産生

細胞の分化に関与する」(口演)

- (5) 藤猪英樹、阿戸学、高橋宜聖、橋本修一、中山俊憲、谷口克、小安重夫、竹森利忠 「HIVnef 発現により誘導される成熟 T 細胞の機能低下」(ポスター)
- (6) 山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋宜聖、橋本修一、加地友弘、竹森利忠 「不活化インフルエンザウイルスに含まれる白血球数減少活性の刺激」(ポスター)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

○ B6 ● IFN- α/β R KO

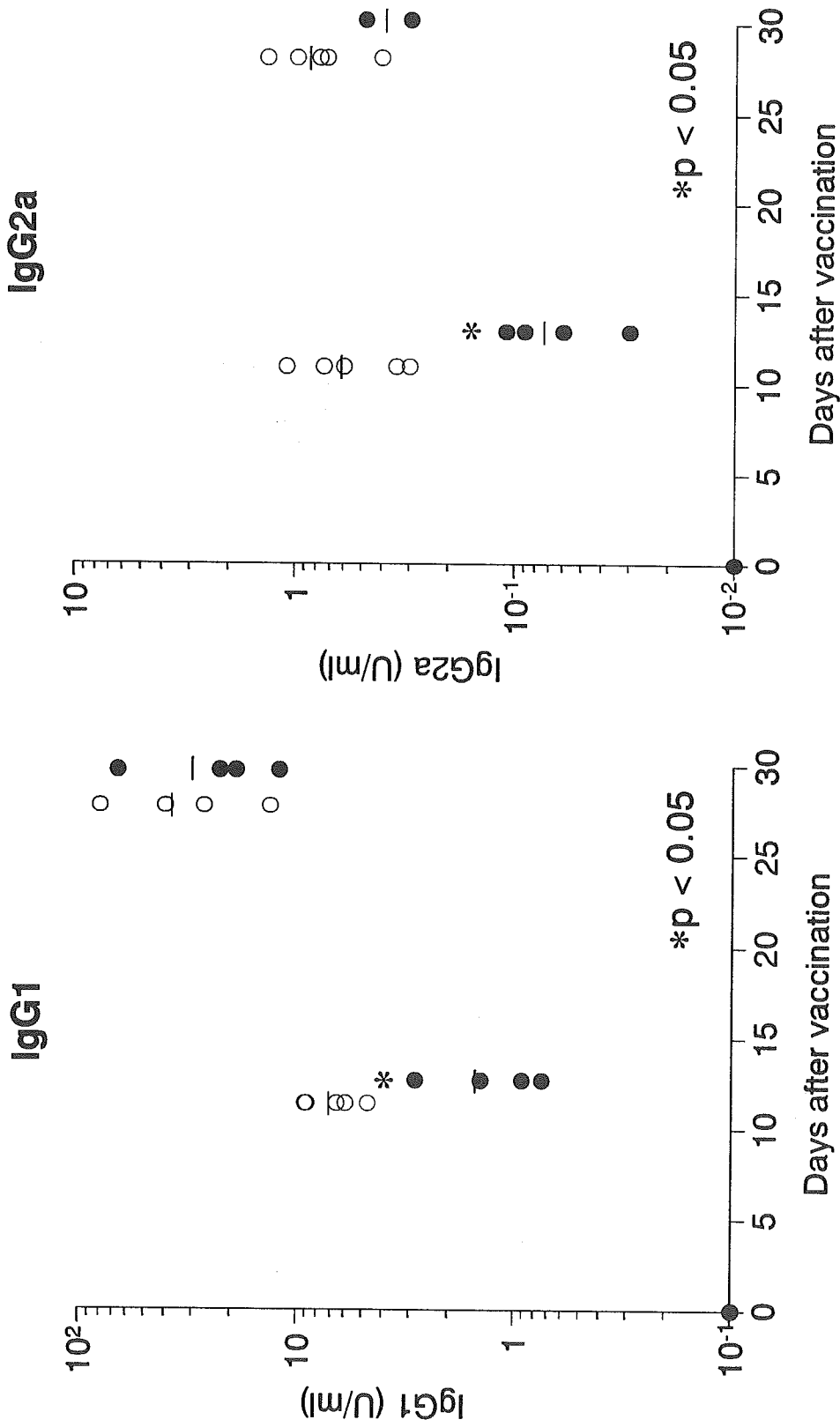


图1 IFN- α/β レセプター欠損マウスにおける抗インフルエンザ抗体産生応答
不活化全粒子ワクチンで免疫後、14日目と29日目の抗インフルエンザウイルス抗
体価をELISA法で測定した。

□ B6 ■ IFN- α / β R KO

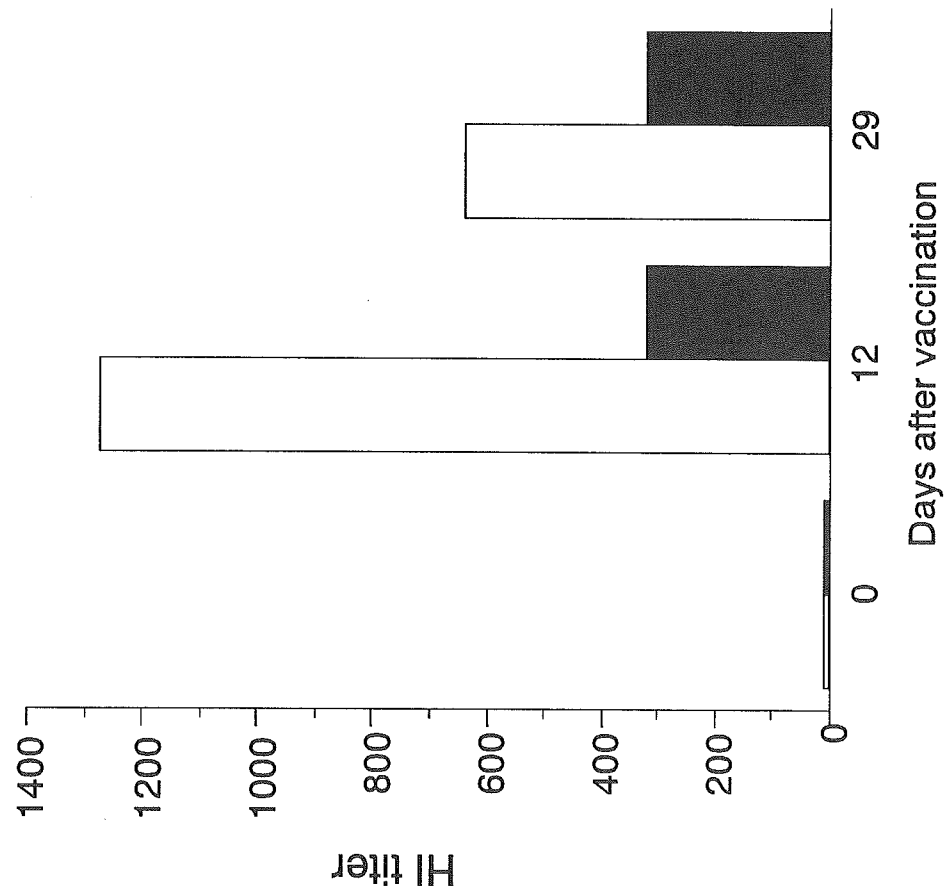


図2 IFN- α / β レセプター欠損マウスにおけるHI抗体価

H3N2不活化全粒子ワクチンで免疫後、14日目と29日目のHI抗体価を測定した。

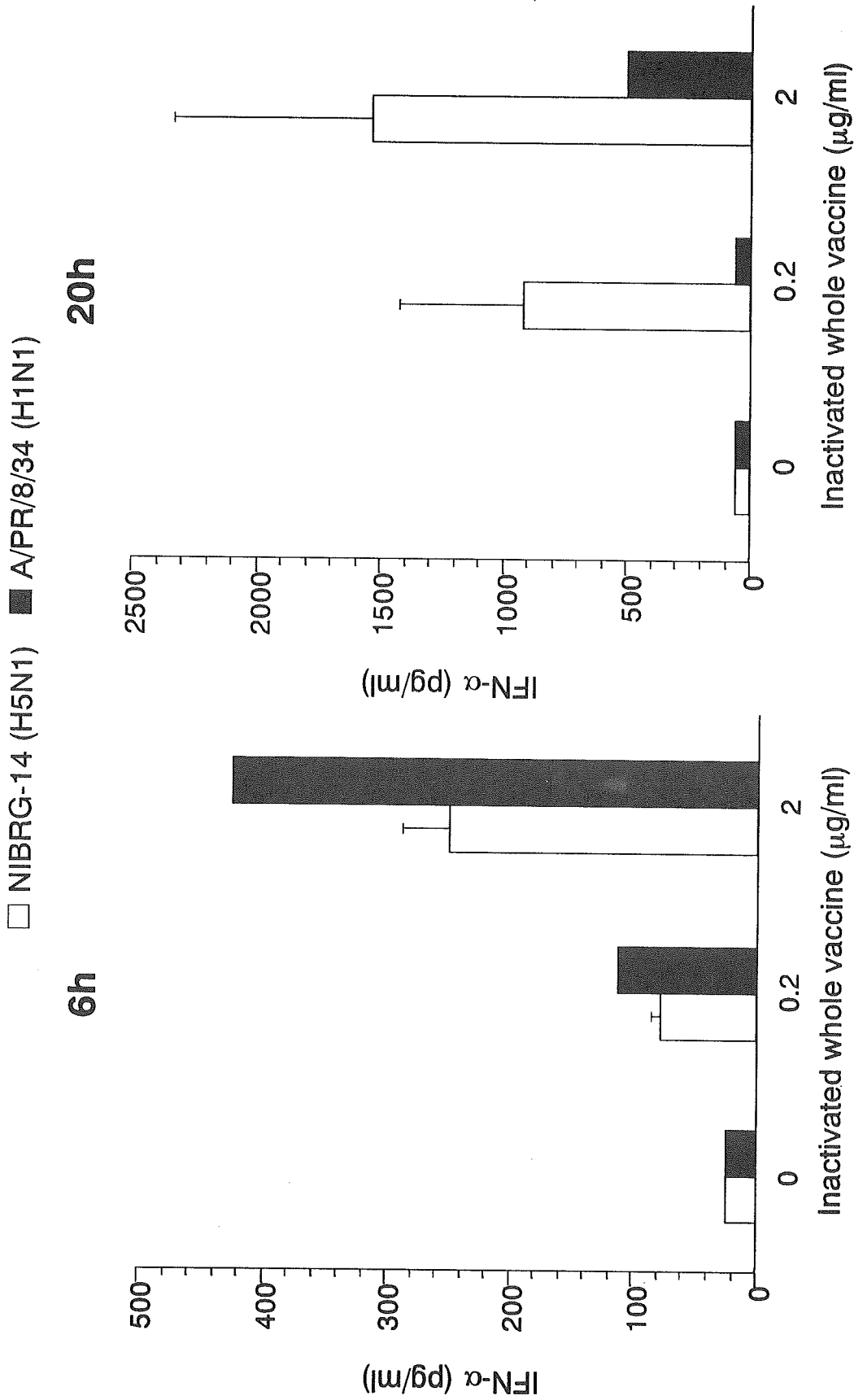


図3 不活化全粒子によるIFN- α 産生誘導能の比較
 マウス脾臓細胞を不活化全粒子の存在下で6時間と20時間培養した後、
 上清中に産生されたIFN- α の濃度をELISA法により測定した。

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ネコにおけるインフルエンザウイルスの感染機構の解析

分担研究者	山田章雄	国立感染症研究所獣医科学部	部長
協力研究者	棚林 清	国立感染症研究所獣医科学部	室長
	藤田 修	国立感染症研究所獣医科学部	研究員
	堀田明豊	国立感染症研究所獣医科学部	研究員
	宇田晶彦	国立感染症研究所獣医科学部	研究員
	山本美江	国立感染症研究所獣医科学部	研究員

研究要旨 ネコでの高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染機構を明らかにすることを目的に、ネコ組織におけるインフルエンザウイルス受容体であるシアル酸分子の解析とネコ由来培養細胞でのウイルス増殖について検討した。鳥類由来インフルエンザウイルスが指向性のあるとされている α 2-3 結合シアル酸分子が気管繊毛上皮細胞に分布することが分かった。また、鳥類由来ウイルスがネコ由来培養細胞でも増殖することからネコが鳥類由来インフルエンザウイルスに感受性であることを支持している。さらにレクチンの反応条件や染色方法を検討するとともに他の組織における受容体の分布状況や各種動物細胞でのウイルス感受性を検討する必要があると考えられる。

A. 研究目的

H5N1 亜型インフルエンザウイルスによる家禽の高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)発生時にヒトへの致死感染がアジアやヨーロッパにおいても発生して問題となっている。タイにおいては感染鶏を喫食した飼い猫やユキヒョウ、トラなどネコ科動物での感染が起こった。さらに、実験感染でネコが H5N1 亜型ウイルスに感受性であることや同居感染が成立することが明らかになっている。しかし、ヒトでの H3N2 亜型流行ウイルス株は感染しなかったと報告されている。

インフルエンザウイルスの宿主特異性を規定する因子の一つとしてウイルス受容体の違いが言われている。本ウイルスの受容体は細胞表面に存在するシアル酸を含む分子であるが、鳥類由来インフルエンザウイルスは、シアル酸の隣接するガラクトースとの結合様式が α 2-3 結合の分子を、ヒト由来のウイルスは α 2-6 型の分子を

認識しやすいとされている。

本研究では、ネコでのインフルエンザウイルスの感染機構を明らかにすることを目的にネコの組織におけるインフルエンザウイルス受容体であるシアル酸分子の解析とネコ由来培養細胞でのウイルス増殖について検討した。

B. 研究方法

1. ネコ組織における受容体の解析

ネコの気管、肺の組織を OCT コンパウンドにて急速冷凍し、クライオスタットにて凍結切片を作製した。風乾後、冷アセトンで固定した。シアル酸の結合様式を区別して認識結合するジゴキシングニン標識レクチン (*Maackia amurensis* agglutinin, MAA および *Sambucus nigra* agglutinin, SNA) (ロッシュ社)を切片に反応させた。PBS で洗浄後、FITC 標識抗ジゴキシングニン抗体を反応させレクチン結合部位を蛍光顕微鏡

で観察した。レクチンの結合特異性を確認するためにフェチュインとレクチンを混和後反応させた。

2. ネコ由来培養細胞でのウイルス増殖

ネコの腎臓由来細胞株である CRFK およびマクロファージ様細胞株である fcwf-4 を用いた。対照として MDCK 細胞を用いた。ウイルスは、HPAI の発生があった養鶏場近くで採取されたオオクロバエより分離されたウイルス (A/blowfly/Kyoto/93/2004/ H5N1) で、発育鶏卵で増殖させ MDCK 細胞で感染価を測定した。CRFK、fcwf-4 および MDCK 細胞に MOI 約 0.1 でウイルスを接種し、37°C で 1 時間吸着、洗浄後、培養液を加えて 37°C で培養した。経時的に培養上清を回収しその感染価を MDCK 細胞で測定した。

C. 研究結果

1. ネコ組織における受容体の解析

ネコ気管の凍結切片組織に α 2-3 結合シアル酸を認識するレクチン MAA を反応させ蛍光染色したところ繊毛上皮細胞に明らかな蛍光が観察された(図 1A)。MAA にフェチュインを加えて反応させるとその反応は阻害され蛍光シグナルが減弱した(図 1B)。また、肺においても肺胞上皮細胞に MAA との反応が認められた(図 1C)。

一方、 α 2-6 結合シアル酸を認識する SNA を反応させた場合では全体に反応が弱く判定しにくかったことから染色条件や陽性対照材料と比較するなどの検討をしなければならないが、気管の繊毛上皮細胞よりは、基底膜および粘膜固有層の血管に反応している様であった。

2. ネコ由来細胞でのウイルス増殖

H5N1 亜型 HPAI ウイルスをネコ由来 CRFK および fcwf-4 細胞、対照としてイヌ由来の MDCK 細胞に MOI 約 0.1 で接種し培養上清中のウイルス感染価を測定した(図 2)。いずれの細胞においても感染後 24 時間で 10^3 から $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.1ml のウイルス増殖が見られた。fcwf-4 細胞では MDCK 細胞よりも高い感染価を示した。3 日目では $10^{2.5}$ から 10^3 TCID₅₀/0.1ml とどの細胞でも

感染価は低下したが、これは細胞変性効果による細胞障害の進行によると考えられた。

D. 考察

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染鶏の喫食により哺乳類動物であるネコやトラなどに感染が起き、さらに実験的感染も成立することが報告されているがその感染機構、特に鳥類由来インフルエンザウイルスのネコにおける受容体認識やネコ由来細胞での増殖性の検討はされていない。本研究において、ネコの気管や肺では鳥類由来インフルエンザウイルスが認識するとされる α 2-3 結合シアル酸受容体が主に存在することが示され、鳥類由来ウイルスがネコに感染できることを支持している。 α 2-6 結合シアル酸受容体については、反応条件の更なる検討が必要であるが、気管や肺の存在量は少ないように観察され H3N2 ヒト流行株がネコへ感染しなかった報告を説明するかもしれない。

鳥類由来ウイルスがネコ由来培養細胞においてインフルエンザウイルスの分離や感染価測定に利用される MDCK 細胞と同等の増殖を示したことはネコが鳥類由来インフルエンザウイルスに感受性であることを示している。

今後、ネコの組織における受容体分布状況についてはニワトリやブタの組織を対照にしてレクチンの反応性について詳細な比較検討が必要であるとともに、実験感染ネコにおいてウイルス増殖が報告されている他の組織についての検討や他の各種動物細胞でのウイルス感受性の検討が必要と考えられる。

E. 結論

ネコの気管や肺におけるインフルエンザウイルスの受容体であるシアル酸分子の解析を行ったところ鳥類由来インフルエンザウイルスが指向性のあるとされている α 2-3 結合シアル酸分子が気管繊毛上皮細胞に分布することが分かった。また、鳥類由来ウイルスがネコ由来培養細胞でも増殖することからネコが鳥類由来インフルエ

ンザウイルスに感受性であることを支持している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kyoko Sawabe, Keita Hoshino, Haru- hiko Isawa, Toshinori Sasaki, Toshihiko Hayashi, Yoshio Tsuda, Hiromu Kuraha- shi, Kiyoshi Tanabayashi, Akitoyo Hotta, Takehiko Saito, Akio Yamada and Mu- tsuo Kobayashi. Detection and Isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2006, in press) .

2) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 林利彦, 津田良夫, 倉橋弘, 棚林清, 堀田明豊, 山田章雄, 西藤岳彦, 小淵正次, 田代真人, 小林睦生. 2004 年高病原性鳥インフルエンザ国内流行地で採集されたクロバエ類からの H5N1 亜型インフルエンザウイルスの検出と分離. 病原微生物検出情報, 26: 119-121, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

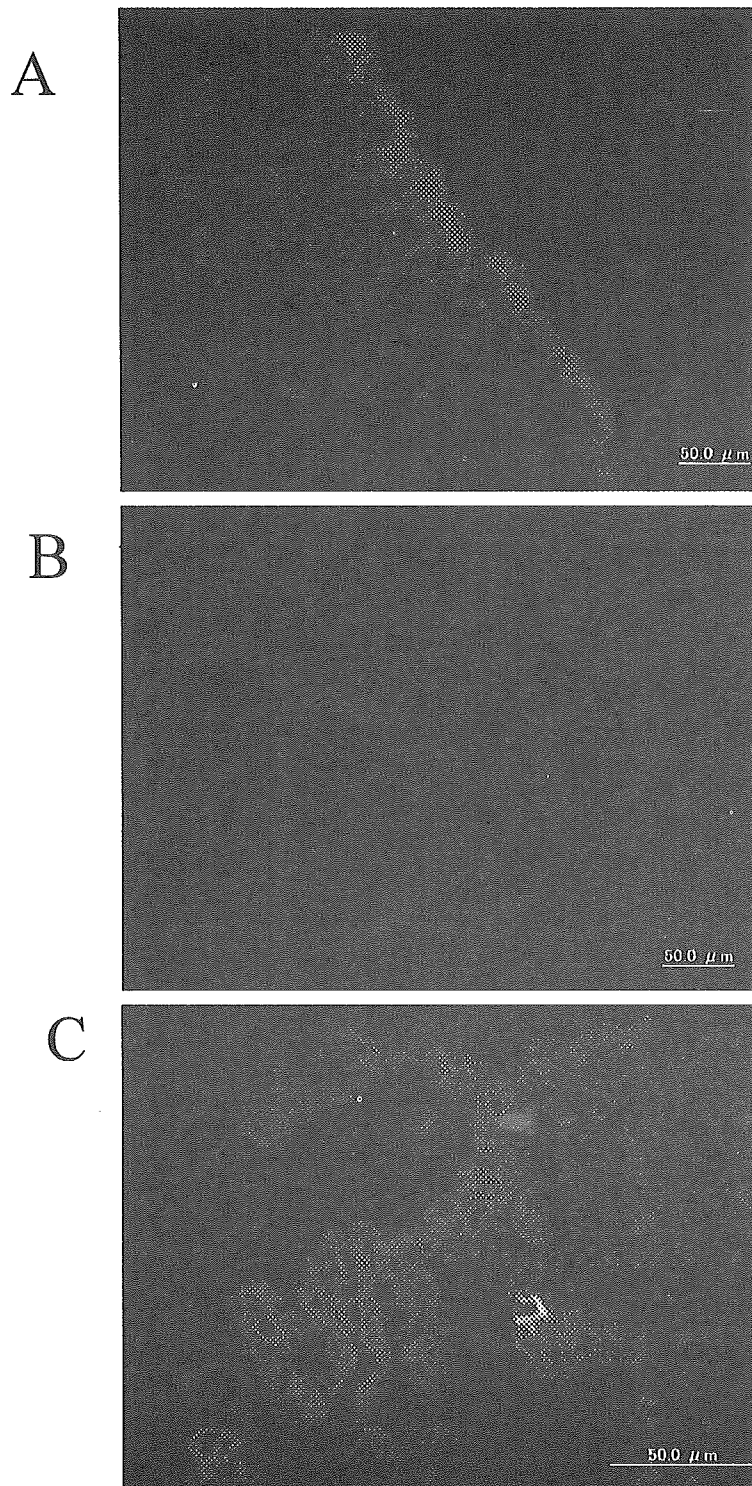


図1. ネコの気管および肺のジゴキシゲニン標識レクチンMAAを用いた蛍光染色像

A, B: 気管、C: 肺

BではDIG-MAAとフェチュインを混合後反応させた。

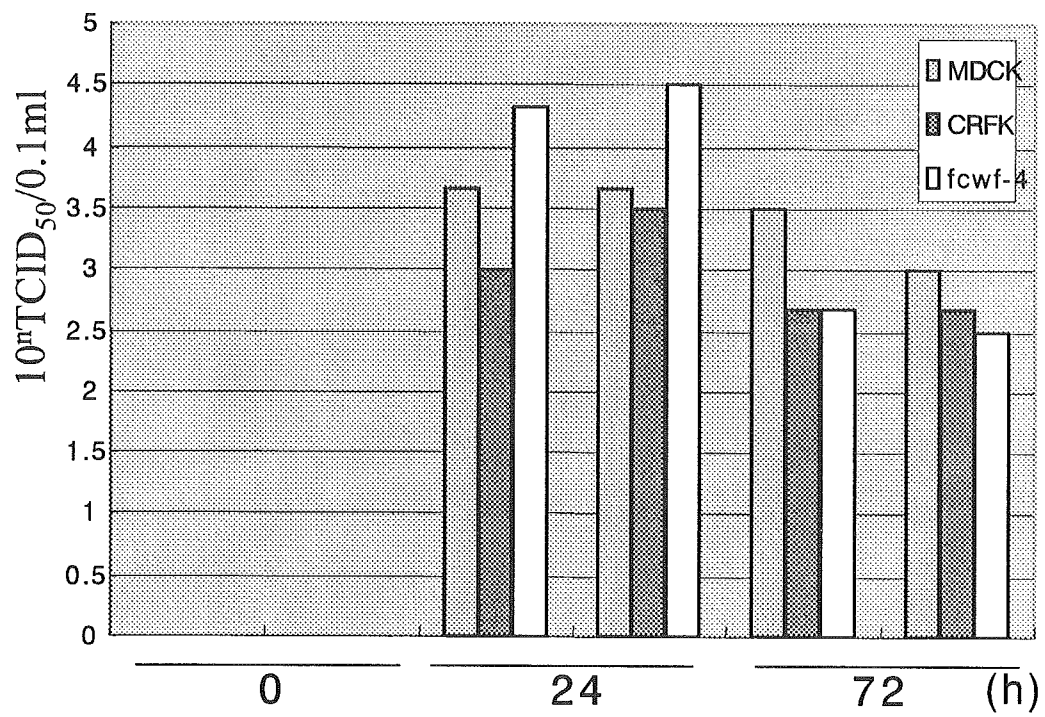


図2. 高病原性鳥インフルエンザウイルスのネコ由来培養細胞での増殖

オオクロバエの殺虫剤感受性

分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所）

研究協力者：駒形 修，葛西真治，津田良夫，富田隆史（国立感染症研究所）

研究要旨 フェニトロチオンとペルメトリンは家畜害虫の防除用途で最もよく使われている殺虫剤である。高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)ウイルスが 2004 年に京都府の汚染鶏舎の周辺で採集されたオオクロバエから分離，同定されたことを契機として，これら 2 つの殺虫剤のオオクロバエ(*Calliphora nigribarbis*)に対する有効性を調査した。2004 年に国内で初めて HPAI が流行した山口県で採集した成虫を直接用いて，局所施用法による殺虫試験を行った。フェニトロチオンとペルメトリンの LD50 値は，それぞれ，0.078 mg/fly と 0.0136 mg/fly であった。この結果は，山口県で採集されたオオクロバエがこれら 2 つの主要な殺虫剤に対して感受性であることを示した。

A. 研究目的

オオクロバエ(*Calliphora nigribarbis*)は日本を含む東アジア諸国に分布している。幼虫は動物の糞と死体で発育する(Hayashi and Shinonaga, 1979)。成虫は年に一度春期に発生し，長いもので 1 年の寿命をもち，雌は 11 月から 3 月にかけての冬期に産卵する(Kurahashi et al., 1994)。オオクロバエの飛翔活動は冬期にも非常に活発だが，夏期には本州とそれ以南の地域で成虫は低地に姿を見せなくなる(Kurahashi, 1991; Kurahashi et al., 1991; Kurahashi et al., 1994; Kurahashi and Suenaga, 1997)。このことが，本種はこれまで鶏舎，豚舎，および牛舎で化学的防除の対象とみなされない理由であり，春期から秋期にかけて発生する典型的な家畜害虫であるイエバエやヒメイエバエとは大きく事情が異なる点である(Gotoh et al., 1991)。

1997 年に香港で高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)が流行して以来，その感染拡大は養鶏業だけでなくヒトの健康に係わる世界的な関心事となっている(Subbarao et al., 1998; Yuen et al., 1998)。日本では，79 年前の国内発生の記録以来，2004 年冬季に 2 県 1 府の 4 つの鶏舎でその流行が起きた。2004 年 2 月にアウトブレイクが起き

た京都府丹波町の一つの養鶏場から 2.5 km 以内でのハエ類の捕集において，オオクロバエとケブカクロバエ(*Aldrichina grahami*)の 2 種が，ハエの優占種として採集された。採集された 2 種のハエは，H5N1 型 HPAI ウイルスに重度に汚染されていた(Sawabe et al., 2005a; Sawabe et al., 2005b)。2004 年 3 月を始めとして，HPAI ウイルスの感染ルートを知る調査が行われてきたが，渡り鳥と留鳥の調査からは未だその感染ルートは明らかになっていない。2004 年に京都府の 2 つの近隣する鶏舎で連続して HPAI がアウトブレイクしたことの例からも，ウイルスの伝播に係わるクロバエ類の潜在的役割を見過ごすことはできない。HPAI 感染の生じる可能性のあるルートを年間を通じて遮断するためには，冬期に活発に活動し優勢な衛生害虫種であるクロバエ類を防除の対象に加える必要があるといえる。オオクロバエはその主要な対象種であり，病原体を保有しその伝播の担い手となる可能性のある昆虫を防除することが特定家畜伝染病予防指針にも定められている。しかしながら，これまでオオクロバエの殺虫剤感受性については報告されることがなかった。

本研究では，野外で捕獲したオオクロバエを

直接用いてフェニトロチオンとペルメトリンに対する感受性を試験し、その感受性レベルを殺虫剤感受性と抵抗性のイエバエに比較して評価した。試験した殺虫剤は、それぞれ、畜舎用途に登録されている有機リン系またはピレスロイド系化合物の中で代表的なものである(JVPA, 2004)。

B. 研究方法

薬品：フェニトロチオン (O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate, 純度 97.2%) とペルメトリン(3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate, 91.2%)は住友化学工業(株)より供与された。

昆虫：オオクロバエ成虫は 2004 年 11 月 30 日に山口市で採集した。成虫は室内環境に順化させるために 24 から 48 時間の間、16L:8D の明暗期のもと 20℃で水と砂糖を与えて飼育し、その後毒性試験に用いた。イエバエの SRS 系統は WHO の標準対照感受性系統である。採集したオオクロバエと SRS 系統イエバエの体重は、それぞれ、250 頭と 11 頭を使い測定した。イエバエは羽化後 5 から 7 日目の未経産雌を使った。オオクロバエとイエバエの平均体重はそれぞれ、58 mg と 28 mg であり、その比、2.9:1、は両種間で体重あたりの致死薬量を比較する際に適用した。

毒性試験：フェニトロチオンまたはペルメトリンを含むアセトン溶液 0.5 μ L を PB600-1 リピーティング・ディスペンサー(Hamilton)を用いて雌成虫の胸背面に付着させた。対照区のハエにはアセトンのみを施用した。処理後、ハエは 10 頭ごとにプラスチック容器(直径 10 cm, 深さ 5 cm)に入れ、25℃に保ち砂糖と水を与えられた。24 時間後に生残したハエの数を数え、LD50 は SPSS (SPSS Inc.)により計算した。

C. 研究結果

山口市で採集した雌バエを使い局所施用法に

より毒性試験を行った。その結果を図 1 と表 1 に示す。フェニトロチオンとペルメトリンに關する LD50 値は、それぞれ、0.078 mg と 0.014 mg と推定された。各々の観測値には若干の外れ値が含まれていたが、得られた結果は有意水準 5% でプロビット曲線に適合した。殺虫剤感受性における不均一性は、野外で採集したハエそのものに含まれる遺伝的変異もしくは不均一な生理的条件、あるいはその両方により、おそらく生じたものであろう。日本産のクロバエ科 (Calliphoridae)ハエについて殺虫剤感受性の報告があるのはオビキンバエ(*Chrysomya megacephala*)のみである(Mihara and Kurahashi, 1991)。今回求めた 2 つの殺虫剤に関するオオクロバエの感受性は、このオビキンバエの感受性に非常に類似していた。

科が異なるイエバエとオオクロバエの殺虫剤感受性を比較するために、2 種ハエの体重比を考慮して変更した LD50 値を求めた(表 2)。この比較から、各殺虫剤に対するオオクロバエと殺虫剤感受性イエバエの感受性レベルが同等であると推論した。オオクロバエ一頭あたりで求めた LD50 値は、実際に散布される際の殺虫剤の有効性をも示している。その理由は、一頭の表面積あたりのこれらの薬量は、畜舎で殺虫剤が散布される際の通常の有効成分濃度、0.1 から 1 g/m² (JVPA, 2004)、と比べてかなり下回っているからである。

D. 考察

今回の試験は 1 地点での採集に基づくものであるが、オオクロバエは長距離の飛行能力を有し(Kurahashi, 1991; Kurahashi et al., 1991; Kurahashi et al., 1994; Kurahashi and Suenaga, 1997)かつ幼虫が冬期に発育するので殺虫剤の曝露を受ける機会が夏期に発生する他のハエ類より少ないことを考慮すると、日本各地に分布するオオクロバエの集団は類似した殺虫剤感受性を示すのではないかと推測される。一般的に、殺虫剤抵抗性は畜舎におけるハエ類を始めとす

る害虫防除にとって最大の問題といわれている (Yasutomi and Tomioka, 2000)。仮に日本産オオクロバエが今回の結果に示されたような殺虫剤感受性レベルだとしても、実際の防除に際しては別の難しい問題に直面することになるであろう。それは激しくせわしなく飛び回るオオクロバエの高い飛翔能力による。殺虫剤の直接噴霧や畜舎への残留処理だけでは畜舎のオオクロバエを十分に防除することは容易でない可能性がある。しかしながら、日本で動物用医薬品として登録されている殺虫剤の種類は、農薬に比べて極端に少ない(JVPA, 2004)。その内訳は、ピレスロイド系と有機りん系の殺虫剤が主力であり (表 3 : JVPA, 2004 より要約したもの)、さらにその有効成分の大部分が防疫用殺虫剤に使われているものと共通である(Shono, 2005)。オオクロバエの生態を考慮し、散布用の殺幼虫剤と殺成虫剤、および毒餌剤など利用可能なあらゆる剤型を活用し、鳥インフルエンザのアウトブレイクに応じた害虫の総合的防除を計画する必要がある。その一方で、オオクロバエの活動を想定して、動物用途で限られた種類の登録済み有効成分または未登録の有効成分を元にした新しい剤型が開発されることも望まれる。

E. 結論

1. 2004 年山口市で採集したオオクロバエは、主要な家畜害虫用殺虫剤のフェニトロチオンとペルメトリンに対し感受性であった。
2. その感受性レベルは殺虫剤感受性イエバエと同等であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Komagata O, Kasai S, Tsuda Y, Kobayashi M, Tomita T (2006) Insecticide susceptibility of the blow fly, *Calliphora nigribarb*is Vollenhoven, *Medical Entomology and Zoology*, 57 (in press).

2. 学会発表

富田隆史, オオクロバエの薬剤感受性, 第 57 回

日本衛生動物学会大会殺虫剤研究班研究集会, 2005 年 6 月 1 日.

駒形修, 葛西真治, 津田良夫, 小林睦生, 富田隆史, オオクロバエの殺虫剤感受性, 第 58 回日本衛生動物学会大会, 2006 年 4 月 7 日.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

(無し)

2. 実用新案登録

(無し)

3. その他

(無し)

Table 1. Regression analyses of the blow fly mortalities by two insecticides.

	Pearson's Goodness-of-Fit			N	Slope	S.E.	LD50 (µg/fly)	95% C.L.
	χ^2	df	P					
Fenitrothion	7.274	4	0.122	110	1.30	0.28	0.078	0.040-0.123
Permethrin	0.781	3	0.854	110	1.14	0.25	0.014	0.007-0.025

Table 2. Comparison of insecticide-sensitivity between two fly species.

Insects	LD50 (µg/fly)	
	Fenitrothion	Permethrin
Blow fly (after modified by weight) *1	0.027	0.0047
Housefly (SRS strain) *2	0.039	0.0069

*1, Modified by multiplying a weight ratio of the housefly to the blow fly, 1/2.9

*2, Averaged from three references (Shono et al., 1982; Yasutomi et al., 1988; LEE et al., 1996)

Table 3. List of major active ingredients in the insecticides registered for animal use.

Groups	Chemical names
pyrethroids	allethrin, bioresmethrin, cyfluthrin, etofenprox, permethrin, phenothrin, prallethrin, resmethrin, tetramethrin
organophosphates	azamethiphos, dichlorvos, fenitrothion, prothiofos, trichlorfon
carbamates	carbaryl, fenobucarb, propoxur
Insect growth regulators	cyromazine, diflubenzuron, pyriproxyfen
synergists	piperonyl butoxide

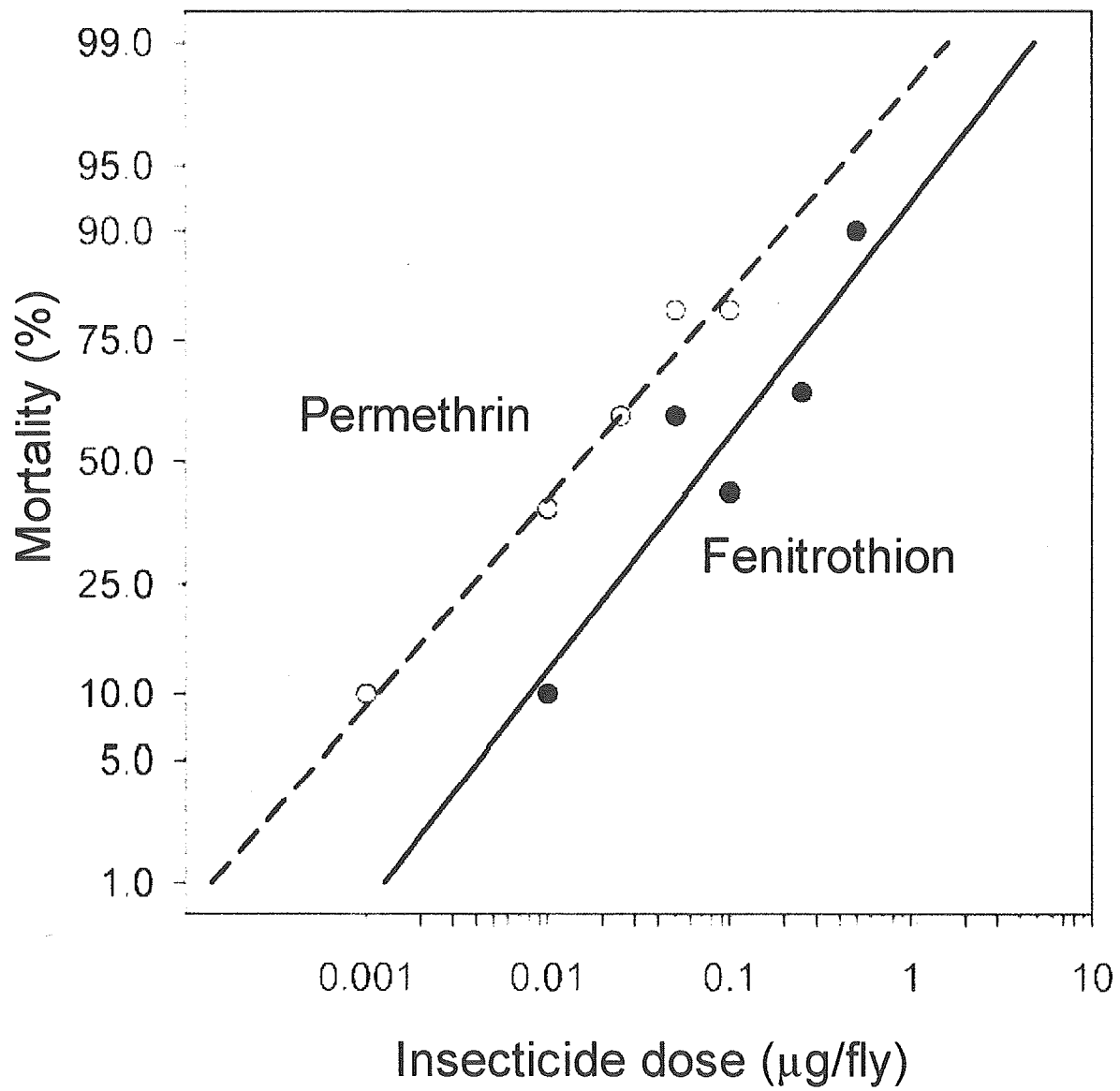


Fig.1 Mortality curves of the blow fly (Yamaguchi 2004).

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

オオクロバエ体内における H5N1 インフルエンザウイルスの生存に関する研究

分担研究者 小林 睦生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長)
研究協力者 澤邊 京子 (同・昆虫医科学部 室長)
佐々木年則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)
星野 啓太 (同・昆虫医科学部 流動研究員)
伊澤 晴彦 (同・昆虫医科学部 研究員)
林 利則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)
津田 良夫 (同・昆虫医科学部 室長)
倉橋 弘 (同・昆虫医科学部 客員研究員)
棚林 清 (同・獣医科学部 室長)
堀田 明豊 (同・獣医科学部 研究員)
山田 章雄 (同・獣医科学部 部長)

研究要旨: 2004 年 2 月京都府丹波町での高病原性トリインフルエンザ流行時に採集したオオクロバエとケブカクロバエから、H5N1 亜型インフルエンザウイルス遺伝子が検出され、同時にウイルスを分離した(A/blow fly/Kyoto/93/2004/H5N1)ことを昨年度報告した。本年度は、ハエ体内でどの程度の期間ウイルス活性が維持されるかを検討するために、人為的にウイルスをオオクロバエに摂食させ、その後一定期間飼育したのち継時的に消化管(そ嚢および腸管)を摘出し、発育鶏卵接種によるウイルス分離と、MDCK 細胞培養系を用いてウイルス titer の測定を行った。

その結果、ウイルスを摂食したオオクロバエの実験期間である 14 日間のほぼすべての検体からウイルス遺伝子の存在が確認されたが、活性のあるウイルスが分離された期間は摂食後 24 時間までであった。MDCK 細胞培養系においても同様に、摂食後 24 時間まではウイルス力価が測定されたが、24 時間以降は検出限界を下回るレベルに低下した。発育鶏卵接種および MDCK 細胞培養系の両結果から、本ウイルスのオオクロバエ体内での増殖は認められなかったが、少なくとも 24 時間以内は生存可能であることが判明した。

オオクロバエは 1 日に数 km は容易に移動することから、その距離内にある近隣の鶏舎などにウイルス活性が保持された状態でオオクロバエが移動した可能性は高く、本ウイルスの伝播、拡散にオオクロバエなどのハエ類が貢献する可能性が示唆された。

A. 研究目的

2003～2004年に山口、大分、京都の計4箇所で開催した高病原性トリインフルエンザはわが国では79年ぶりの流行となった。昨年度の研究成果で我々は、京都府丹波町でのトリインフルエンザ流行時にハエ類の調査を行ったところ、オオクロバエとケブカクロバエが有意に多く捕獲され、両種の消化管から高率にH5N1亜型インフルエンザAウイルス遺伝子が検出、同時にウイルスが分離された(A/blow fly/Kyoto/93/2004/H5N1)ことを報告した。また、当時丹波町周辺のクロバエ類における本ウイルス遺伝子の陽性率は10-30%(平均20%)と高率であり、オオクロバエの約5%が活性のあるウイルスを保持していたことが推定された。オオクロバエより分離されたウイルス株は、発生農場でウイルス感染により死亡した鶏由来の分離株とほぼ100%の相同性を示したことから同一株であると判定された。少なくとも、高病原性トリインフルエンザが丹波町で発生した当時のような状況下では、近隣の鶏舎間へのウイルス伝播にクロバエ類が関与した可能性が推察された。しかしながら、この結果だけではクロバエ類がわが国の高病原性トリインフルエンザの流行にどの程度関与していたかを判断するには十分ではない。クロバエの体内でインフルエンザウイルスがどのくらいの期間活性があるのか、クロバエの長距離移動を含む飛翔範囲、クロバエと鶏との接触ルートなど検討されるべき課題は多い。

そこで本研究では、クロバエ体内でウイルス性が維持される期間を明らかにするために、オオクロバエへの摂食実験を計画した。これによって、クロバエとウイルスとの親和性を把握し、インフルエンザウイルスの伝播者としてのハエ類の関与を考察した。

B. 研究方法

1. オオクロバエへのウイルス摂食実験

1) ウイルス液の調整

H5N1亜型インフルエンザAウイルス弱毒株(A/duck/Hyogo/35/01, 神戸市環境保健研究所より分与)を発育鶏卵で増殖させ、しょう尿膜腔より回収した。MDCK細胞によりウイルス量を定量し、ウイルス液の初期量(原液)を 10^8 TCID₅₀/mlに調整した。

2) オオクロバエ *Calliphora nigribarbis*

室温20°C、70-75%RHの条件の昆虫飼育室内で継代飼育されたオオクロバエ *Calliphora nigribarbis* の羽化2日前の蛹(蛹化後約12日)を70%エタノールで数秒間浸漬消毒し、滅菌済み大鋸屑の入ったプラスチック容器に移し、20cm立方金網ケージ内で羽化させた。羽化後は雌雄混在のまま約3%の砂糖水を与えて飼育し、10日後にCO₂麻酔下でメス成虫を選別した。使用器具はすべて滅菌し、飼育期間中の操作においても極力汚染を減らすよう心がけた。

3) クロバエへのウイルス摂食

事前に絶食させた羽化後約14日のメス成虫に、1個体当たり50μlになるようにシャーレ内の脱脂綿にウイルス液を滲み込ませ約3時間摂食させた(シャーレ当たり約5mlを使用した)。オオクロバエメス成虫の消化管の容量は約25μlであるので、十分に摂食した場合は最大で 2.5×10^6 TCID₅₀量のウイルスを取り込んだ計算になる。3時間摂食させた直後のオオクロバエから消化管(そ嚢および腸管)を摘出し体表およびフラスコ内壁を洗浄した。それ以外の個体は3% Sucrose, 0.7% Agar培地(シヨウジョウバエ培地組成に準じた)の入った滅菌

済み三角フラスコ内に個別に入れ、シリコン栓をした後一定期間を 20°C 下に維持し、継時的に解剖しウイルス乳剤を作成した。本ウイルスの低温条件下での生存率を見るために、一部のオオクロバエは 10°C で 14 日間飼育した。

2. ウイルス分離および遺伝子検出

1) ウイルス分離用サンプルの作成

オオクロバエは MEM 培養液で体表を軽く洗浄後、ホールグラス上で解剖し消化管(そ嚢および腸管)を摘出した。それぞれを個別に細胞破砕機 MM300 (QIAGEN) で破砕後軽く遠心しウイルス乳剤を作成した。フラスコ内壁に付着したクロバエの吐出物や排泄物は MEM 培養液で洗浄し、スクレイパーで回収、虫体洗浄液と混和した。各ウイルス乳剤は最終量 0.8ml になるように調整し、その 0.2ml をウイルス遺伝子の検出に用い、残りの 0.6ml を発育鶏卵接種法によるウイルス分離および MDCK 細胞培養系によるウイルス titer の測定に使用した。ウイルス液を滲み込ませた脱脂綿はクロバエによる摂食終了後、同様に 20°C で 14 日間保管し、継時的に脱脂綿を切断して MEM 培養液中で遠心後上清を回収しウイルス乳剤とした。一連の作業はすべて安全キャビネットの中で行った。

2) ウイルス分離

ウイルス分離用乳剤は 3 倍希釈し、各 0.2ml を 2 個の鶏卵に接種した。3 日後しょう尿膜腔液を回収し、HA テストおよび flu A+B kit (Becton, Dickinson and Company) のいずれかで陽性反応を示したしょう尿膜腔液を陽性とし、少なくとも 1 個の発育鶏卵で分離が成功すれば陽性クロバエと判断した。ウイルス分離が成功した検体についてのみ、残ったウイルス乳剤の 10 段階希釈液を MDCK 細胞に接

種し細胞変性効果 (CPE) を観察し、ウイルス titer を Reed- Muench 法により算出した。

3) ウイルス遺伝子の検出

ウイルス RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、Takara One Step RNA PCR kit (AMV) を用いて RT-PCR を行った。M (マトリックスタンパク) あるいは HA (へマグルチニン) 遺伝子断片のいずれかが検出された検体をウイルス遺伝子陽性と判定した。遺伝子検出に用いたプライマーは以下のセットである。

(1) M 遺伝子 (231bp, ウイルス三部より提供)
TypeA/M30f: TTC TAA CCG AGG TCG AAA CG;
TypeA/M264r: ACA AAG CGT CTA CGC TGC AG

(2) HA 遺伝子 (708bp, 感染研ホームページより参照)
H5 515f: CAT ACC CAA CAA TAA AGA GG;
H5 1220r: GTG TTC ATT TTG TTA ATG AT

RT 反応は 48°C で 45 分 → 94°C 2 分間熱変性し、その後 94°C 1 分 → 45°C 1 分 → 72°C 2 分の PCR 反応を 45 回繰り返し、72°C 10 分 → 4°C で保管した。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンス法により PE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いて解析した。

C. 結果

1. ウイルス分離結果

1) 実験 1 (表 1)

オオクロバエの摂食後 24 時間までのそ嚢からインフルエンザウイルスが分離された。腸管からは 9 時間後に 1 個の鶏卵でウイルスが確認されたが、それ以降 6 日まで、そ嚢および腸管のいずれからもウイルスは分離されなかった。また、クロバエ体表の洗浄液と吐出物、排泄物からも実験期間中ウイルスの存在は確

認められなかった。

2) 実験 2(表 2)

実験 1 において、摂食直後にもかかわらずウイルスが分離されたクロバエは、そ嚢、腸管ともに3個体中2個体からであったことから、すべてのクロバエが十分にウイルスを摂食していない可能性が示唆された。そこで、クロバエに摂食前6時間を絶食させ、直後に10個体からウイルス分離を行った結果、うち2個体のウイルス titer は検出限界以下であったが、10個体のすべてのクロバエからウイルスは分離された。この条件下ではほぼすべてのクロバエが十分にウイルスを取り込んだものと判断した。実験2の結果は1とほぼ同じ傾向で、クロバエ摂食後の24時間までのそ嚢と腸管からウイルスが分離され、クロバエ体表の洗浄液と吐出物、排泄物からは48時間後の1個体からのみウイルス分離が確認された。

2004年丹波町でクロバエ類の採集を行った前後の気象データ(図は省略)から、多数のハエ類が捕獲された3月10・11日と同じような気象条件(平均気温10℃、日照時間8-10時間)の日に遡ると2月21日頃が該当した。したがって捕獲された個体の多くがウイルスに汚染したエサを摂食した日は、捕獲日より14~16日前頃であった可能性が浮上した。そこで当時の寒冷な気温を10℃前後と想定し、摂食したクロバエを10℃下に14日間維持した後、同様にウイルス分離を試みたが、そ嚢、腸管のいずれからでもウイルスは分離されなかった。この結果は、2004年丹波町で捕獲されたクロバエ類の一部は、捕獲の14~16日前にウイルスを摂取した可能性があるが、ウイルスが分離された個体は捕獲される直前にウイルスを取り込んだ可能性が高いと思われる。

MDCK 培養細胞を用いてウイルス titer を測

定したところ(図1)、摂食直後はそ嚢で1.67-4.63 \log_{10} TCID₅₀/0.05ml(平均3.15±1.12)、腸管で0.5-4.0(平均2.91±1.2)と高い値を示したが、時間を追うごとに急激に減少し、24時間後にはそ嚢で1.67、腸管で0.5以下と検出限界以下に低下した。虫体洗浄液などのクロバエ体外から回収されたウイルスは実験期間中を通してウイルス活性はほとんど測定できなかった。

表1および2に示されるように、クロバエ消化管内でウイルス活性が維持される期間は24時間以内であることが分かった。一方、摂食終了後20℃で保管されたウイルスの滲み込んだ脱脂綿は48時間後まで高いウイルス titer (4.5-5.6 \log_{10} TCID₅₀/0.05ml) が維持されていた。

ウイルス遺伝子検出結果の詳細は省略するが、実験期間中14日までのほぼすべての検体からウイルス遺伝子は検出された。

D. 考察

ハエ類が30種類以上の病原体、たとえばポリオウイルスや七面鳥コロナウイルス、腸管出血性大腸菌 O157 や条虫卵などを機械的に伝播することはよく知られている。イエバエ(*Musca domestica* L.)の伝播能を評価した感染実験は、たとえば七面鳥コロナウイルス(TCV)を摂食したイエバエの9時間後にそ嚢からウイルスが分離され(Dawnら, 2003)、豚繁殖呼吸器症候群ウイルス(PRRSV)では、12時間後に行われた豚に対する生物検定で陽性判定を示し、24時間後までPCR判定結果が陽性であったという報告(Otakeら, 2003)などがある。

本研究ではイエバエよりも大型であるオオクロバエを実験に用いたが、そ嚢および腸管の大きさを加味すると、上記イエバエでの結果とほぼ同程度の結果が得られたと言える。H5N1

インフルエンザウイルスは、オオクロバエの体内で少なくとも 24 時間は活性を有した状態で生存していることが発育鶏卵接種および MDCK 細胞培養系のいずれにおいても明白であった。本結果は、インフルエンザウイルスはクロバエ体内では増殖しないことも示されたが、24 時間という短くない期間、感染性のある状態でウイルスがハエ体内で保持されれば、少なくとも近隣の鶏舎間を行き来し、次の感染源となる可能性は十分にあることを示唆している。オオクロバエは 1 日に数 km 以上は容易に移動すると言われており、その距離内にある近隣鶏舎などへの移動は可能であると思われる。しかしながら、実際にクロバエ類がどのくらいの距離を飛翔できるかについては、野外調査も詳細には行われておらず、また、実験的に裏付けされた数値もほとんど報告されてはいない。野外において、あるいは室内実験においての詳細な調査を今後の課題としたい。

近年、東南アジア諸国、欧州諸国においても H5N1 亜型ウイルスの流行は依然として収束しておらず、むしろ流行の範囲は拡大する方向にある。また、わが国においても、低病原性 H5N2 亜型インフルエンザウイルスの感染は茨城県内で相次いでおり、ハエ類を視野に入れたウイルスの伝播機構の解明は急務である。また、東南アジア諸国においては一年を通じて多種のハエ類が発生する状況にあり、その種構成はわが国とは大きく異なっていると想像されることから、昨年度我々が京都府丹波町を中心に行った野外調査で明らかになったような、インフルエンザの流行する時期と冬季に活動するクロバエ類の組み合わせだけではなく、まったく異なったハエ類が東南アジア諸国でのインフルエンザウイルス伝播に貢献している可能性は高い。

最後に、本研究で、発育鶏卵接種および MDCK 細胞培養系においてウイルスが分離され、ウイルス titer が測定可能であった期間は、クロバエがウイルスを摂食した後 24 時間までであったが、ウイルス遺伝子は 14 日間の実験期間を通してほぼ最後まで検出されていた。このことは、遺伝子検出だけの判定は本来の感染状況を把握するには不十分であることを意味しており、遺伝子検出と並行してウイルス分離が行われるべきであることを示唆した結果でもある。

E. 結論

H5N1 亜型インフルエンザ A ウイルス弱毒株を摂食したオオクロバエは 14 日後までのほぼすべての検体でウイルス遺伝子が検出されたが、ウイルスが分離された期間は摂食後 24 時間以内の消化管(そ嚢および腸管)からのみであった。同一検体からの MDCK 細胞培養系によるウイルス titer 測定結果からも、摂食直後はそ嚢で $1.67-4.63 \log_{10}TCID_{50}/0.05ml$ (平均 3.15 ± 1.12)、腸管で $0.5-4.0$ (平均 2.91 ± 1.2) であったのが、時間を追うごとに急激に減少し、24 時間後にはそ嚢で 1.67、腸管で 0.5 検出限界以下になった。この結果から、本ウイルスはオオクロバエの体内で増殖しないまでも少なくとも 24 時間の生存は可能であり、近隣の鶏舎などへの本ウイルスの伝播、拡散にオオクロバエなどのハエ類が貢献する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) Kyoko Sawabe, Keita Hoshino, Haruhiko Isawa, Toshinori Sasaki, Toshihiko Hayashi, Yoshio Tsuda, Hiromu Kurahashi, Kiyoshi