

ワクチン免疫原性強化技術の開発

分担研究者	高橋 宜聖	国立感染症研究所免疫部	主任研究官
研究協力者	阿戸 学	国立感染症研究所免疫部	主任研究官
	小林 和夫	国立感染症研究所免疫部	部長
	二宮 愛	国立感染症研究所ウイルス第3部	研究員
	小田切 孝人	国立感染症研究所ウイルス第3部	室長
	田代 真人	国立感染症研究所ウイルス第3部	部長

研究要旨

新型インフルエンザ用ワクチン (NIBRG-14) を接種したマウスでは、赤血球凝集や細胞変性を阻止する血清中和抗体価と感染防御能の相関性が低く、従来のインフルエンザワクチンと異なるメカニズムで感染防御が成立すると推察される。NIBRG-14 ワクチンが惹起する感染防御機構を明らかにする目的で、NIBRG-14 ワクチン接種マウスから、血清とリンパ節細胞 (CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、B 細胞) を調製し、様々な組み合わせで先天性リンパ球欠損 (scid) マウスに移入した。その結果、リンパ球を移入した scid マウスでは、強毒株の攻撃実験に対するマウス生存率の改善が認められない一方で、血清を移入した scid マウスは完全に耐過することが明らかとなった。またヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) 以外 NIBRG-14 と同じ分子から構成される A/Puerto Rico/8/34 の不活化全粒子を接種したマウス血清では、感染防御効果が付与されないことから、従来の中和抗体測定法では検出が困難な HA に対する抗体、あるいは NA に対する血清抗体が感染防御に必要な因子であることが判明した。

A. 研究目的

新型インフルエンザ用ワクチン (NIBRG-14) をマウスに接種した場合、ウイルスによる赤血球凝集や細胞変性を阻止する中和抗体価の顕著な増加を伴わず、強毒株に対する強い感染防御効果が付与される。本研究は、NIBRG-14 接種により惹起される感染防御因子を同定し、これを応用した免疫原性強化技術の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) 不活化全粒子ワクチンの調製とマウスへの

接種

リバーシジェネティクスによりヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) 以外を A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) 由来に置き換えた H5N1 型 ワク チ ン 株 NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/04 由来) と、対照として PR8 を使用した。各ウイルスを発育鶏卵で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製し、0.05%ホルマリンで不活化した。5 ug HA に相当する不活化全粒子/アラムを BALB/c マウスに2回皮下接種した。一部の BALB/c マウスは、CD8 陽性 T

細胞を除去するため 500 ug の抗 CD8 抗体を 2 回腹腔内投与した。

(2) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) による HA 特異的抗体価の測定

パキウイルス発現系にて NIBRG-14 と PR8 の組換え HA タンパクを作製した。組換え HA タンパクまたは不活化全粒子を ELISA プレートにコーティングし、1% BSA でブロッキング後、段階希釈したマウス抗血清を加え、HRP 標識した抗マウス IgG1 抗体で検出した。最大吸光値の 1/2 の吸光値を生じる血清希釈率を判定し、これをユニット値としてグラフに表示した。

(3) ELISPOT 法による抗体産生細胞の頻度測定

組換え HA タンパクをコーティングしたニトロセルロース膜上にて脾臓細胞と骨髄細胞を 2 時間培養した後、HRP 標識した抗マウス IgG1 抗体を加え、HA に対する抗体産生細胞をスポットとして発色させた。最終的に、添加細胞あたりのスポット数を計測し、抗体産生細胞の頻度を測定した。

(4) HI (hemagglutination inhibition) 抗体価と中和抗体価の測定

0.5% 鶏赤血球を用いた HI 試験、または MDCK 細胞を用いた中和試験により、抗血清中の中和抗体価を評価した。HI 試験は 4 HAU の不活化全粒子ワクチンを用いた赤血球凝集の阻害活性を、中和試験は 100 TCID₅₀ のウイルスによる細胞変性の阻害活性を指標とした。どちらの試験でも、阻害活性を示す血清希釈率の最大値をグラフに表示した。

(5) 強毒 H5N1 株による攻撃実験

NIBRG-14、PR8 不活化全粒子を 2 回接種したマウスから、腋窩リンパ節と血清を採取した。リンパ節細胞は、磁気ビーズ細胞分離法を用いて B 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞に分画した。一部の CB17-scid マウスには、リンパ節細胞 (2 x 10⁷ 個)、B 細胞と CD4⁺T 細胞 (1 x 10⁷ 個ずつ)、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞 (1 x 10⁷ 個ずつ) を移入した。別の群の CB17-scid マウスには、0.8 ml の抗血清を移入した。移入した scid

マウスや抗 CD8 抗体で処理した BALB/c マウスに 20 LD50 の強毒ベトナム株 (A/VN/JP1203/04) を経鼻感染させ、2 週間にわたり生存率を観察した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設の SPF 区、BSL-3 区域にて行ない、倫理面を含め国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

C. 研究結果

(1) NIBRG-14 ワクチンの抗血清に含まれる HI 抗体価と中和抗体価の測定

二宮らの研究結果から、NIBRG-14 ワクチンは 2003 年香港株由来の H5N1 ワクチンと比較して、マウス抗血清の HI 活性、中和活性の賦活能の低いことが明らかにされている。この現象をさらに他のサブタイプのウイルス株を用いて確認するため、内部タンパクを共有する PR8 株 (H1N1) から不活化全粒子ワクチンを作製し BALB/c マウスに 2 回接種した (図 1)。すると、PR8 ワクチンを接種したマウスでは、これまで報告されている他のウイルス株同様、HI 抗体価、中和抗体価ともに 427、5120 という高い値を示すのに対し、NIBRG-14 ワクチンを接種したマウスでは、PR8 と比較し HI 抗体価がわずか 26 分の 1、中和抗体価でも 8 分の 1 という低い中和活性しか認められないことを確認した。

(2) NIBRG-14 ワクチンは HA に結合する IgG1 抗体を誘導する

血清抗体の中和活性が低い要因として、1) 何らかの要因で NIBRG-14 の免疫原性が低く、特異抗体の産生量そのものが低いため、2) NIBRG-14 に結合する抗体は作られているものの、何らかの要因で従来法では中和活性の測定が困難なため、という 2 つの可能性が考えられる。これらの可能性を検証するため、NIBRG-14 接種マウスの抗血清中に含まれる特異抗体量を

ELISA 法にて測定した (図 2 左)。まず、中和抗体の主要な標的分子であるヘマグルチニン (HA) 分子に結合する抗体量を測定するため、バキュロウイルス発現系にて組換え HA タンパク (rHA) を作製した。そして rHA に特異的な IgG1 抗体価を比較検討したところ、NIBRG-14 ワクチンを接種したマウスでも、PR8 ワクチン接種マウスと同程度の抗体価が検出された。さらに、血清抗体の大部分を産生する骨髄の抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて比較したところ、血清抗体価同様、NIBRG-14 ワクチン接種マウスと PR8 ワクチン接種マウスの間で有意な違いは認められなかった (図 2 右)。これらの結果から、NIBRG-14 ワクチンは HA に結合する抗体を誘導するにも関わらず、この抗体が従来法では検出されない可能性が示唆された。

(3) 移入実験を用いた感染防御に必要な免疫因子の同定

NIBRG-14 ワクチンの感染防御効果に必要な免疫因子を同定するため、免疫不全 scid マウスを用いた移入実験を行った (図 3)。PR8 ワクチンを接種したマウスのリンパ節細胞と血清は、scid マウスに感染防御効果を付与することができないことから、PR8 にも共通して存在する HA と NA 以外の分子に対する免疫反応に関わる可能性は否定された (図 3 左)。次に、HA や NA に反応する血清抗体が必要なのか、あるいは細胞性免疫が必要なのかを明らかにするため、NIBRG-14 ワクチン接種マウスから調製した血清、あるいは分画したリンパ球を移入し防御効果の有無を調べた (図 3 右)。その結果、血清を移入した場合にのみ強い防御効果が付与されたことから、NIBRG-14 ワクチンにより賦活化される感染防御因子の中心は、HA または NA に結合する血清抗体であると判断した。

(4) NIBRG-14 ワクチンの感染防御能における CD8⁺T 細胞の関与

リンパ節細胞の移入では感染防御効果が付与されないことから、CD8⁺T 細胞に代表される細胞性免疫の関与は低いと考えられる。しかし、移

入した細胞数が少ない等の可能性も否定できないため、別の角度からこの点を検証した。方法として、NIBRG-14 ワクチンを接種した後、強毒株での感染 4 日前に抗 CD8 抗体の投与により CD8⁺T 細胞を除去した。実際、この抗体で処理したマウスでは、リンパ節 CD8⁺T 細胞の頻度が 10% から 0.1% 以下に著しく減少していた。この CD8⁺T 細胞を除去したマウスに強毒株を感染させたところ、除去してない対照マウスと全く同様な感染防御効果を示すことが判明した (図 4)。この結果から、NIBRG-14 ワクチン接種によって CD8⁺T 細胞が活性化し、これが感染防御に重要な役割を果たしている可能性は低いと考えられた。

D. 考察

弱毒 H5N1 型トリインフルエンザウイルスを不活化した新型インフルエンザ用ワクチンは、血清中和抗体価を惹起しづらい点が以前から指摘されていた。この結果を支持するように、2004 年 H5N1 ベトナム株は、中和抗体惹起能の低いことがマウスとフェレット動物モデルにおいて確認されている。しかし、どちらの動物モデルにおいても、強毒ベトナム株に対する感染防御効果は付与されていることから、従来のインフルエンザワクチンとは異なる防御機構の存在が推察される。NIBRG-14 ワクチンの感染防御機構として、1) 従来の中和抗体測定法で検出可能なわずかな中和抗体、あるいは従来法で測定の困難な中和抗体による可能性、2) 中和抗体に依存せず、細胞性免疫に依存する可能性、の 2 点が考えられる。本研究において、ワクチン接種したリンパ節細胞を移入しても、レシピエントマウスに感染防御能は付与されなかったこと、さらに抗 CD8 抗体の投与により CD8⁺T 細胞を除去した状態でも感染防御能に変化が認められなかったことから、細胞性免疫の関与は低いと考えられる。さらに、PR8 ワクチン接種マウスの血清は感染防御因子を含まなかったことから、NIBRG-14 の HA または NA に結合する

血清抗体が感染防御因子である可能性が高い。それでは HA と NA に結合するどちらの抗体が生体内のウイルス中和に関与しているのだろうか？

図2の結果から、NIBRG-14 ワクチンは HA に特異的な抗体を誘導するにも関わらず、従来の中和抗体測定法での検出が困難であった。しかし、全くゼロということではなく、従来の測定法で検出可能なわずかな HA 特異的抗体が生体内でのウイルスを中和する可能性も否定できない。ただし、それ以上に従来法で検出されない HA 特異的な抗体が中和に関与する可能性も十分考えられる。従来法では、HA とシアル酸との結合を阻害する抗体を測定するものの、シアル酸への結合阻害活性の低い HA 特異的モノクローナル抗体が、生体内で強いウイルス中和活性を発現する例が報告されている。このことから、NIBRG-14 ワクチン接種により誘導された HA 特異的な抗体が、何らかの理由でシアル酸結合部位以外の領域を優先的に認識し、これが生体内での感染防御を担う可能性が推察される。また、N1 に結合する抗体も、H5N1 型トリインフルエンザウイルスによる病態軽減に寄与することが報告されており、NIBRG-14 ワクチン接種により誘導される NA 特異的な抗体の役割についても今後検討を進める必要がある。さらに、この免疫現象がヒト免疫系にも適応されるか否か判断するため、免疫細胞の大部分がヒト由来に置換されたヒト化マウスを使用した解析も現在進行中である。

通常の不活化インフルエンザワクチンでは、HI 活性を有する中和抗体と感染防御能が相関するため、血清 HI 抗体価の上昇率を指標とし、ワクチン効果の評価が行われてきた。しかし、NIBRG-14 ワクチンにより惹起される防御免疫反応は、HI 抗体との相関性が低いため、ワクチン効果の評価に HI 抗体価と異なる指標の導入が必要となる可能性を示唆する。本研究のさらなる遂行により、NIBRG-14 ワクチンの感染防御能をより正確に反映した免疫パラメーターが

同定され、これが新しい免疫原性強化技術やワクチン効果の評価法開発に応用されることが期待される。

E. 結論

従来の中和抗体測定法では検出が困難な HA に特異的な抗体、あるいは NA に特異的な抗体が NIBRG-14 ワクチンにより惹起される感染防御因子であると結論づけた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 高橋宜聖 免疫記憶を担うリンパ球とその機能を操る分子メカニズム 蛋白質 核酸 酵素 52: 31-36, 2007
- (2) 高橋宜聖 抗体産生経路の多様性とその生理的意義 化学と生物 45: 27-33, 2007

1. 学会発表

[国内学会発表]

(第36回日本免疫学会総会、大阪、2006年12月)

- (1) 加地友弘、高橋宜聖、橋本修一、竹森利忠
「Pathways for memory B cells」(口演)

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

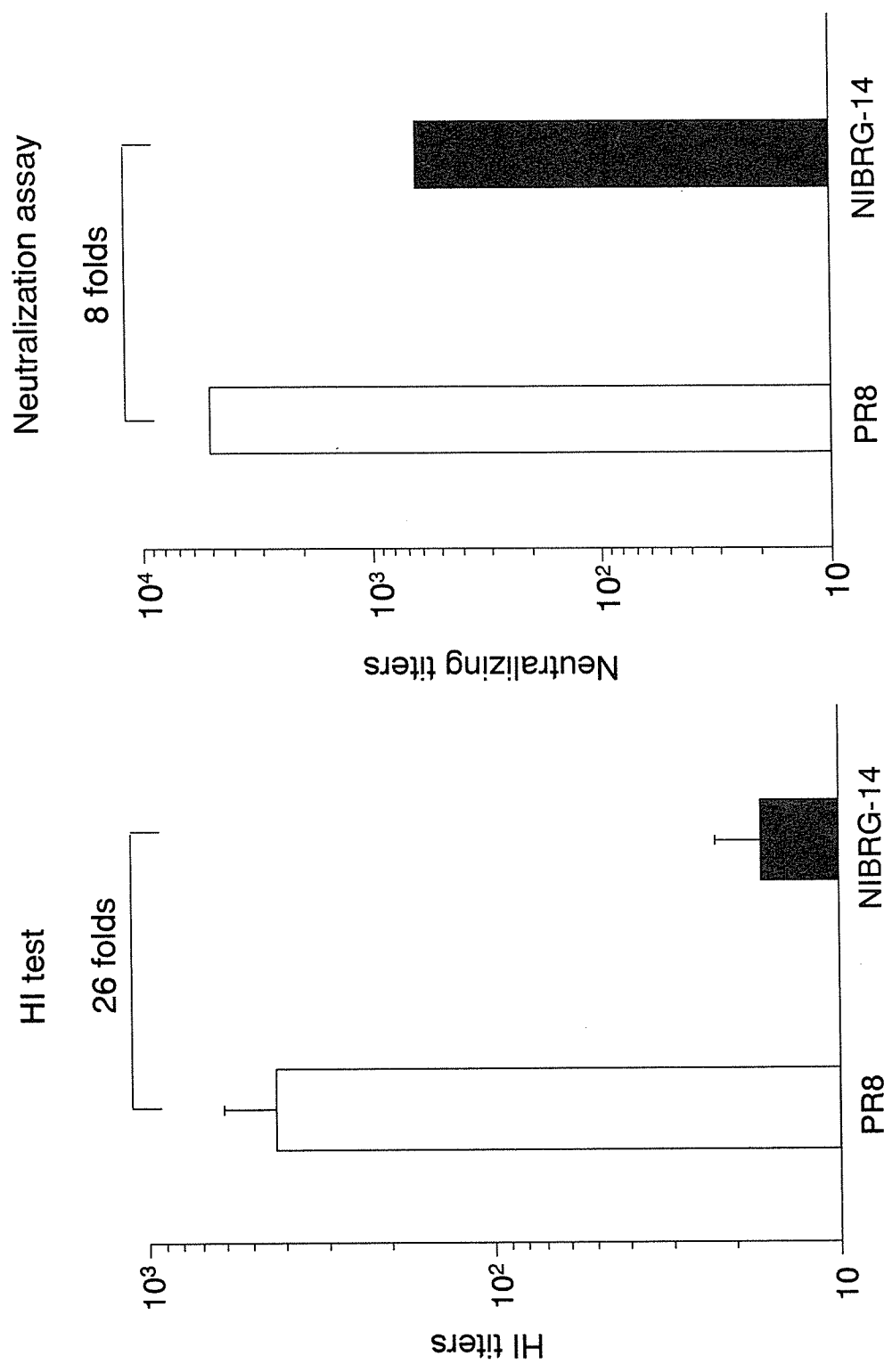


図1 NIBRG-14ワクチンの抗血清に含まれるHI抗体価と中和抗体価の測定
 不活化全粒子ワクチンで2回免疫後、14日目に血清抗体のHI抗体価(左)と中和抗体価(右)を測定した。

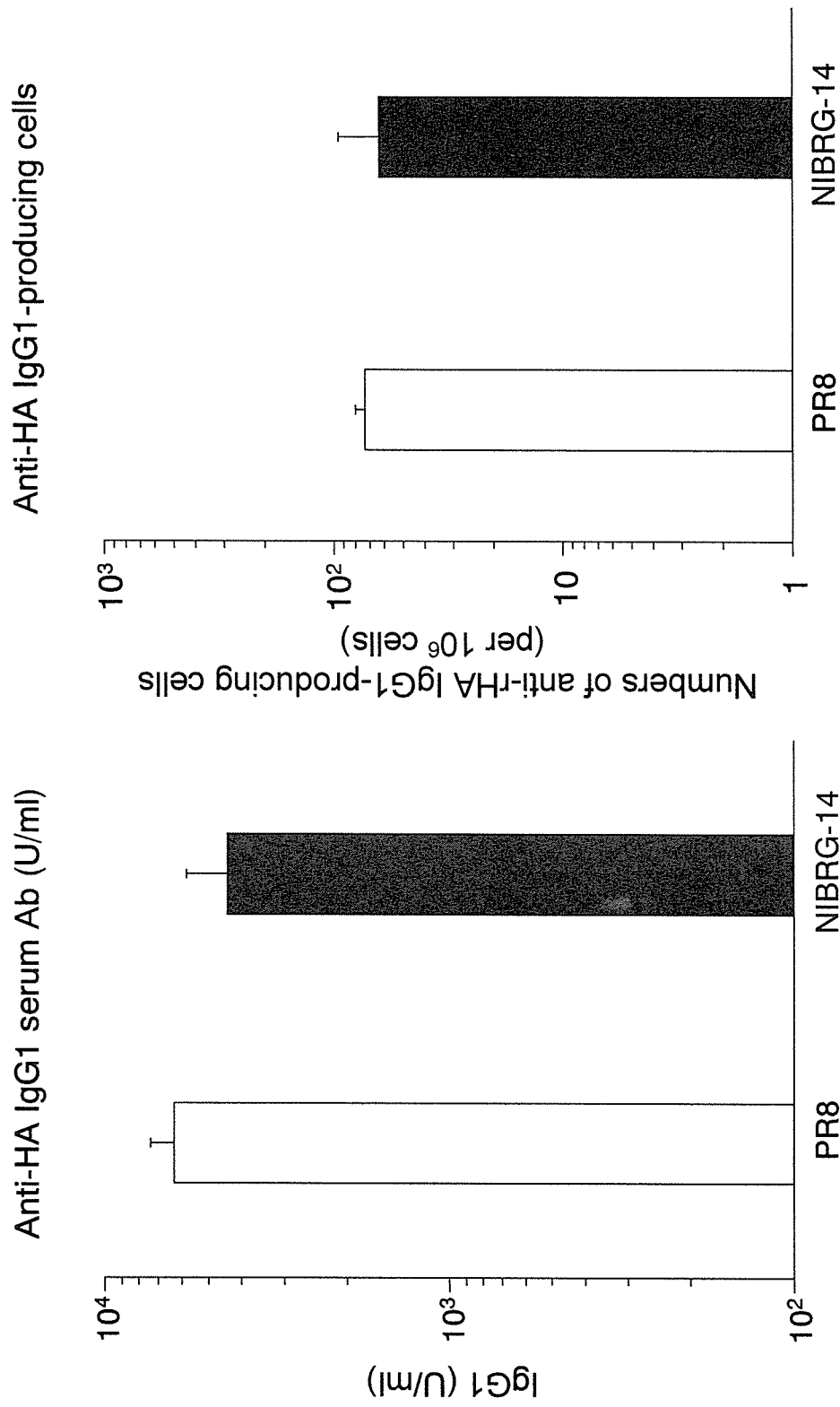


図2 NIBRG-14ワクチンにより誘導されるHA特異的な抗体価と抗体産生細胞数
不活化全粒子ワクチンを2回接種した後、HAに結合する血清抗体価(左)と骨髄抗体産生細胞数(右)を測定した。

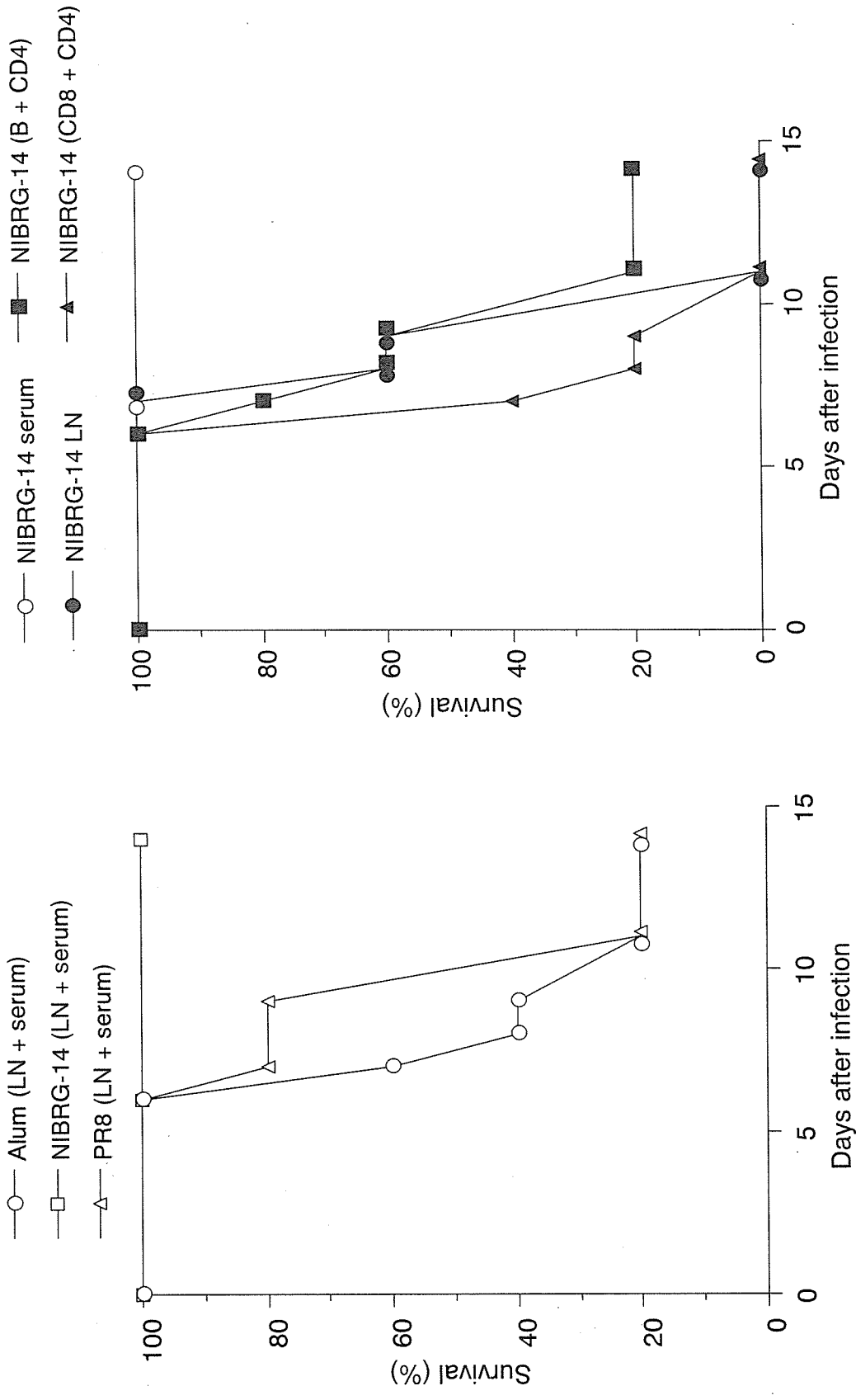


図3 NIBRG-14ワクチンによる感染防御に必要な免疫因子の同定
 (左) 不活化全粒子ワクチンアラム(○;アラムのみ、□;NIBRG-14アラム、△;PR8アラム)を2回接種したBALB/cマウスから、血清ならびにリンパ節細胞を調製し、scidマウスに移入した。移入後、強毒ベトナム株で攻撃実験を行い、生存率の変化を観察した。
 (右)NIBRG-14不活化全粒子ワクチンアラムを2回接種したBALB/cマウスから、血清ならびにリンパ節細胞を調製した。リンパ節細胞は、B細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞に分画した。血清(○)、リンパ節細胞(●)、B細胞とCD4陽性T細胞(▲)、CD8陽性T細胞(▲)をscidマウスに移入した後、強毒ベトナム株で攻撃実験を行い、生存率の変化を観察した。

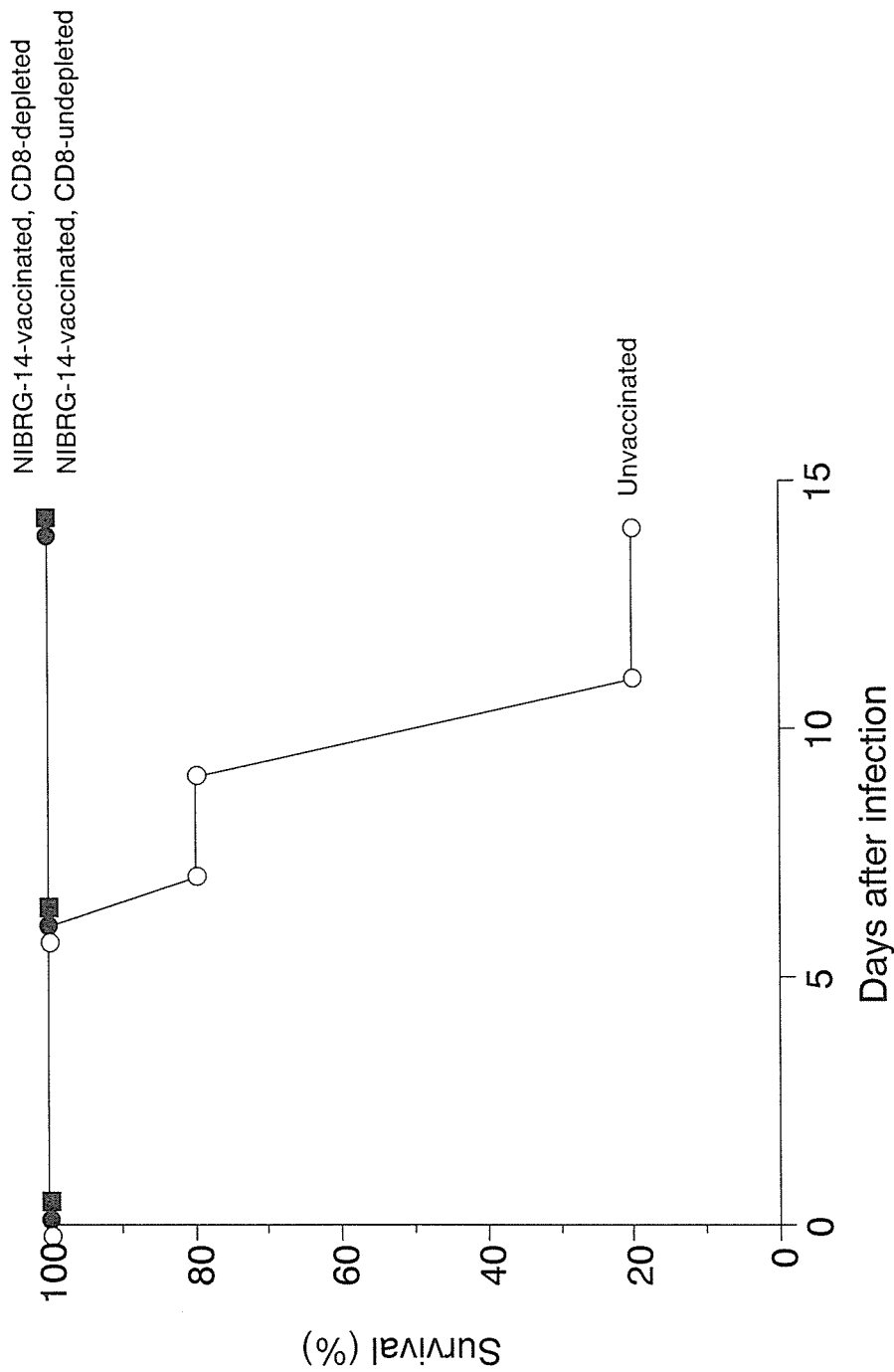


図4 NIBRG-14ワクチンの感染防御能におけるCD8⁺T細胞の役割
 NIBRG-14不活化全粒子ワクチンで2回免疫後、14日目に20LD50の強毒ベトナム株を経鼻感染させた。
 感染4日前から抗CD8抗体を注入してCD8⁺T細胞を除去したマウス(■)と、コントロール抗体を投与したマウス
 (○)、あるいはワクチン接種を行わない対照マウス(○)の生存率を2週間にわたり観察した。

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

鳥類由来インフルエンザ A ウイルスのネコでの感染機構の解析

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 主任研究官
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、ネコ由来培養細胞でのウイルス増殖と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について検討した。鳥類由来インフルエンザウイルスがネコ由来培養細胞 2 株に加えてさらに Fc3Tg と AK-D でも、インフルエンザウイルスの分離培養に用いられる MDCK 細胞と同等またはそれ以上に増殖できることがわかった。また、ネコの気管、気管支さらには角膜には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 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸分子が存在することが分かった。これらの結果は鳥類由来ウイルスがネコにも感染し増殖する要因の一つであることを示しているが、さらに他の組織における受容体の分布状況やウイルスの増殖性を検討する必要がある。

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さらにはアフリカにおいても発生して問題となっている。アジアやヨーロッパでは感染鶏や感染野鳥を喫食した飼い猫やユキヒョウ、トラなどのネコ科動物、テンやミンクなどでの致死感染が報告されている。H5N1 亜型ウイルスのネコへの実験感染でネコが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。一方、ヒトで現在流行している H3N2 亜型

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 $\alpha 2-3$ 結合の分子を、ヒト由来のウイルスは $\alpha 2-6$ 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ており、これまでにネコ気管に α 2-3結合の分子の存在と2種のネコ細胞由来細胞でのニワトリ由来H5N1亜型ウイルスが増殖することを明らかにしてきた。本年度はさらに他の動物由来細胞でのウイルス増殖とネコ組織における解析を進めた。

B. 研究方法

1. 各種動物培養細胞でのウイルス増殖
ネコ由来細胞株として、胎児舌組織由来細胞(Fc3Tg)と胎児肺組織由来細胞(AK-D)を用いた。また、マウス由来細胞株として、ddY新生マウス肺組織由来細胞(MLg)と肺炎アデノマ由来細胞(LA-4)、ウサギ胎児肺由来細胞のR9ab、ヒト肺カルシノーマ由来細胞A549、ならびにインフルエンザウイルスの分離培養によく用いられるイヌ腎由来MDCK細胞を用いた。各細胞に適した組織培養液にウシ胎児血清を添加して培養維持した。

ウイルスは、高病原性鳥インフルエンザ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。各種細胞に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。

2. ネコ組織における受容体の解析

ネコの気管、肺、をはじめ腸管、腎臓、脾臓、角膜などの組織を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。対照としてブタおよびニワトリの気管についても同様に凍結切片を作成し、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する蛍光色素標識レクチンを反応させ蛍光顕微鏡で観察した。 α 2-3結合型分子の検出にはTRITC標識 *Maackia amurensis* lectin, (TRITC-MAA)を、 α 2-6結合型分子の検出にはFITC標識 *Sambucus nigra* lectin, (FITC-SNA-I)(EY Laboratories社)を用いた。これを同一切片に反応させる二重染色により各種ネコ組織における両分子の分布を観察した。

C. 研究結果

1. 各種動物培養細胞でのウイルス増殖

H5N1亜型HPAIウイルスをネコ由来Fc3TgやAK-D細胞をはじめウサギ、マウス、ヒト、イヌ由来細胞にMOI約0.1で接種し、細胞変性効果(CPE)の出現と培養上清中のウイルス感染価を測定した(表1)。ウサギ由来R9abおよびマウス由来MLgとLA-4細胞ではCPEは見られないか弱かった。しかし、ネコ由来のFc3TgとAK-D細胞では著しいCPEがMDCKやヒト由来のA549細胞と同等に観察された。ウイルス接種後、1日目と3日目の培養上清中のウイルス量を測定したところネコ由来細胞ではいずれの細胞においても $10^{2.5}$ から $10^{4.5}$ TCID₅₀/0.1mlのウイルス増殖が見られた。これらはインフルエンザウイルスの増殖によく用いられるMDCK細胞よりも高い値を示した。ウサギやマウス由来の細胞では1日目には少量のウイルスが認められたが3日目には検出限界以下であった。

2. 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異なる蛍光標識したレクチン TRITC-MAA と FITC-SNA-I 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 TRITC-MAA による赤色蛍光が観察された(図 1)。また、ブタ気管においては両方の蛍光色が観察され、ニワトリでは MAA による赤色蛍光が強く観察された(図 1)。これらの結果はネコの気管細胞には $\alpha 2-3$ 結合シアル酸を含む分子が存在し、ブタやニワトリの気管ではこれまで報告されているように $\alpha 2-3$ と $\alpha 2-6$ または $\alpha 2-3$ 分子が存在することを支持している。次に、ネコの各種組織を同様の染色を試みた。肺内の細気管支では MAA と SNA 両レクチンと反応したが、肺胞においては SNA が強く反応した。角膜においてはその表面は MAA レクチンが単一的に反応した。(図 2)。

D. 考察

高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した鶏や野鳥の喫食により哺乳類動物であるネコやトラなどで致死感染事例が報告されている。さらにネコには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。昨年度までの研究において、ネコ由来培養細胞の CRFK や fcwf-4 において鳥類由来インフルエンザウイルスが増殖できることが分かったが、さらに Fc3Tg と AK-D でも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 細胞と同等またはそれ以上に増殖することが分かり、ネコ由

来細胞が鳥類由来インフルエンザウイルスの増殖に感受性であることが確実である。

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 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸受容体が主に存在することが示された。さらに、角膜表面には $\alpha 2-3$ 結合シアル酸受容体が単一的に存在することが TRITC-MAA と FITC-SNA-I レクチンによる二重染色で明らかとなった。結膜での検索は実施していないが、人においては結膜に $\alpha 2-3$ 結合シアル酸を含む分子が存在することを含め鳥由来インフルエンザが経気道感染以外にも眼からの感染の可能性を示している。実際、H7N7 亜型ウイルスがヒトに結膜炎を起こすことが知られている。

ネコでの実験感染では呼吸器系以外の多くの組織でウイルス抗原が検出されており、さらにネコの各種組織における受容体の分布を検索するとともに、摘出臓器で実際にウイルス増殖が出来るのか鳥類由来ウイルスおよびヒト由来ウイルスで比較検討する必要がある。

E. 結論

鳥類由来インフルエンザウイルスがネコ由来培養細胞 2 株に加えてさらに Fc3Tg と AK-D でもインフルエンザウイルスの分離増殖に用いられる MDCK 細胞と同等またはそれ以上に増殖できることがわかった。また、ネコの気管、気管支さらには角膜には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 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸分子が存在することが分かった。これらの結果は鳥類由来ウイルスがネコにも感染し増殖する要因の一つであることを示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

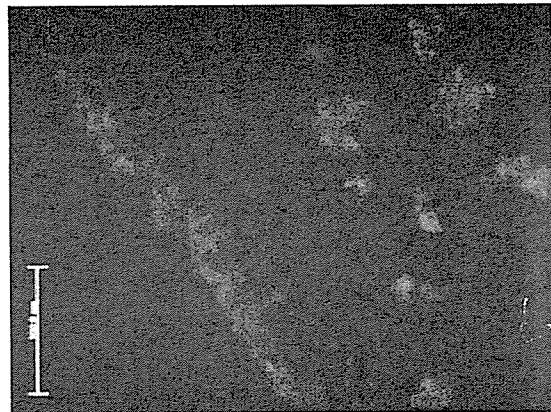
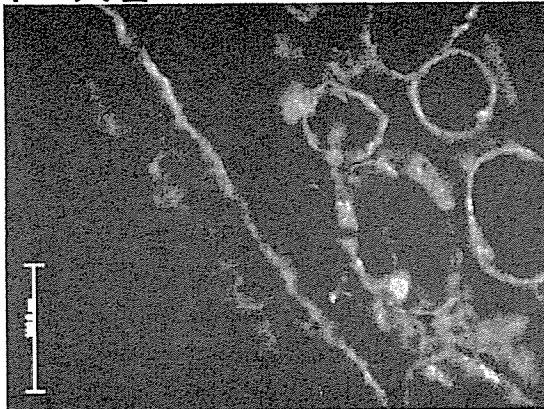
なし

表1:各種細胞での鳥類由来インフルエンザウイルスの増殖

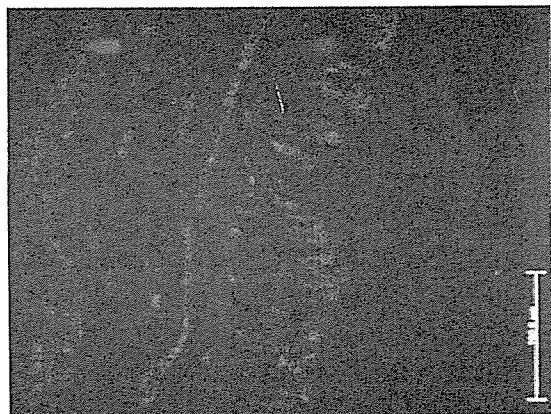
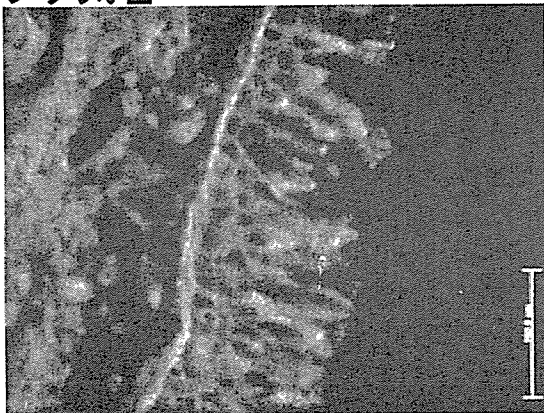
培養細胞	CPE	1dpi	3dpi
MDCK(イヌ腎)	++	3.0, 2.5	2.5, 2.5
R9ab(ウサギ肺)	—	1.0, 1.0	<, <
Fc3Tg(ネコ舌)	++	3.5, 4.0	3.0, 3.3
Mlg(マウス肺ddy)	—	1.7, 2.2	<, <
LA-4(マウス肺アデノーマ)	+	1.7, 1.5	<, <
AK-D(ネコ肺)	++	4.5, 3.5	4.0, 3.3
A549(ヒト肺がん)	++	2.5, 2.3	nt, nt

各細胞2穴における感染価をMDCK細胞で測定し 10^6 TCID₅₀/0.1mlとして表した。ウイルスはA/blowfly/Kyoto/93/2004(H5N1)でトリプシンは添加せずを実施した。

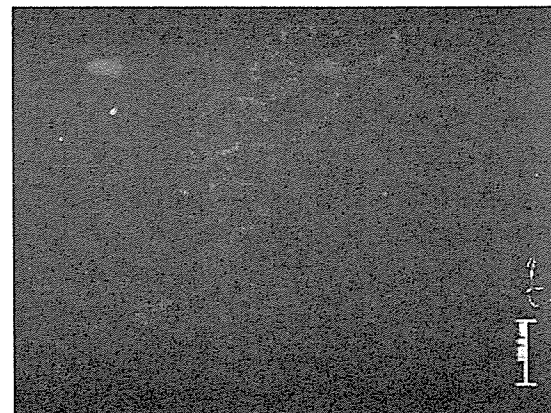
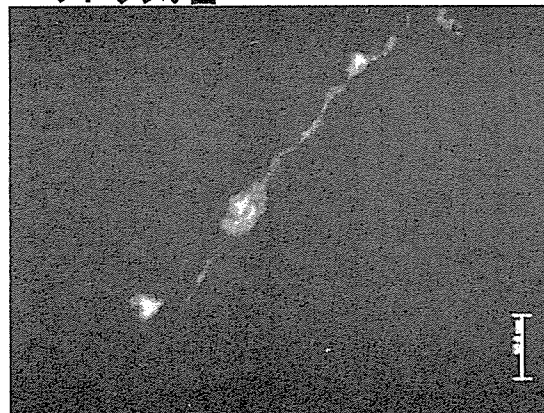
ネコ気管



ブタ気管



ニワトリ気管



SNA($\alpha 2-6$)

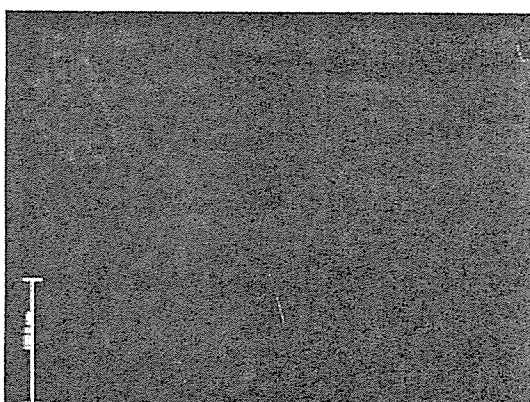
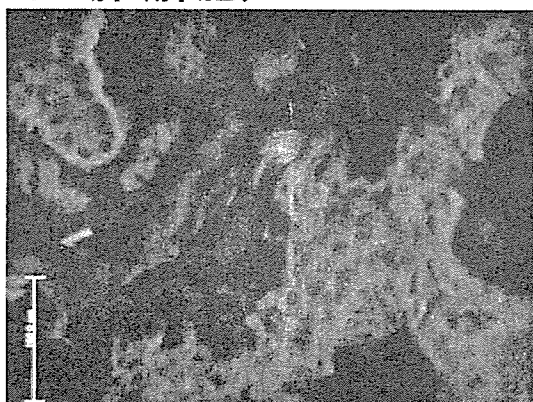
MAA($\alpha 2-3$)

図2:ネコ、ブタおよびニワトリ気管におけるSNAおよびMAAレクチンの反応($\alpha 2-6$ 結合シアル酸 はFITC-SNAにより緑に $\alpha 2-3$ 結合シアル酸 はTRITC-MAAにより赤く染色されている)

ネコ肺(細気管支)



ネコ肺(肺胞)



ネコ角膜



SNA($\alpha 2-6$)

MAA($\alpha 2-3$)

図2:ネコ肺および角膜におけるSNAおよびMAAレクチンの反応($\alpha 2-6$ 結合シアル酸はFITC-SNAにより緑に $\alpha 2-3$ 結合シアル酸はTRITC-MAAにより赤く染色されている)

山口県阿武郡阿東町におけるオオクロバエの mark-release-recapture 実験

分担研究者	小林睦生	国立感染研究所
研究協力者	津田良夫	国立感染研究所
	林 利彦	国立感染研究所
	比嘉由紀子	国立感染研究所
	星野啓太	国立感染研究所
	葛西真治	国立感染研究所
	富田隆史	国立感染研究所
	倉橋 弘	国立感染研究所

我国で最初に高病原性トリインフルエンザの流行が起こった山口県阿武郡阿東町の養鶏場を中心として、半径 1,500m 以内の地域を対象としてオオクロバエの飛翔分散能力を調査する目的で標識再捕獲実験を行った。実験開始後 4 時間で放逐場所から 1,150m 離れた採集地点で 1 個体が捕獲され、実験開始 1 日後に再捕獲された 9 個体は放逐地点から最大 2,000m、平均 1,111m 移動していた。実験期間中の移動距離は一日あたり平均 700m~1,100m に達し、オオクロバエが調査地内を広範囲に移動していたことが明らかになった。

A. 研究目的

京都府船井郡丹波町で高病原性トリインフルエンザの発生が確認された養鶏場の周辺で、クロバエ類の調査を行い多数の成虫を捕獲した。その後の分析の結果、養鶏場から約 600m 離れた場所で捕獲されたオオクロバエの 30% からウイルスが検出され、約 2,000m 離れた場所のサンプルからもウイルスが検出された。この調査結果はクロバエ類が摂食によって死体や糞などからトリインフルエンザウイルスを消化管内に取り込み、これを排泄物と共に排泄するあるいは消化管にウイルスを持ったクロバエが鶏によって捕食されるなどの経路によって、感染拡大にクロバエ類が関与している可能性があることを示唆している。

捕獲されたクロバエ類の中で個体数が多く、ウイルス陽性率が最も高かったオオクロバエは冬に繁殖する種類で、餌となる糞や腐肉を求めて日中活発に飛び回ることが知られている。しかしながら、オオクロバエが実際にどの程度の移動分散能力を有しているかに関しては定量的な調査が行われていない。本研究では、我国で最初に高病

原性トリインフルエンザの流行が起こった山口県阿武郡阿東町の養鶏場を中心として、半径 1,500m 以内の地域を対象としてオオクロバエの飛翔分散能力を調査する目的で標識再捕獲実験を行った。

B. 研究方法

我国で最初に高病原性トリインフルエンザの流行が起こった山口県阿武郡阿東町生雲中の養鶏場を中心とした半径 1,500m の範囲を対象として 2004 年 12 月 1~3 日に調査を行った (図 1)。養鶏場は南西-北東方向に走る 2 本の沢と南東-北西方向に走る 1 本の沢が交差してできた 300×800m ほどのくぼ地に位置していた。オオクロバエの習性から考えて、成虫はこれら 3 本の沢筋に沿って移動すると予想されたため、沢筋に沿った 7ヶ所を捕獲場所として選んだ。捕獲には腐りかけた魚肉をベイトとして用い、誘引されて飛来した個体を捕虫網で捕らえた。

記号放逐実験では捕獲した個体に塗料で印をつけた後その場で放逐し、その後どこで再び捕獲されるかを継続して調査することが基本であるが、開放個体群を対象とした調査方法にはいくつかの異なる

る方法が考案されている。オオクロバエの活動は天候特に日照に大きく左右され、日差しが弱いと極端に活動が鈍くなる。さらに調査を実施した12月初旬は天気が周期的に変化し、安定した天候が続くのは数日である。そこで調査期間を3日間とし、記号放逐実験法の中で3点法 (Triple Catch Method) として知られる調査方法を採用した。

1日目と2日目は塗料によるマーキングと放逐・捕獲を行い、3日目は捕獲のみを行った。マーキングには放逐日と捕獲場所によって異なる色の塗料を用いた。マーキング中に既にマークのある個体が捕獲された場合は、マークの色と捕獲時刻を記録し新たにマークを追加して再度放逐した。

マーキングと放逐を行った場所は A, B1, B2, C の4ヶ所であるが、2日目にはさらに1ヶ所 (D 地点) を追加した。最終日の3日目には、広い範囲での捕獲を目的としてさらに2ヶ所 (D と F 地点) を追加し、合計7ヶ所で捕獲を行った。

C. 研究結果

3日間の調査で合計3,848個体のオオクロバエが捕獲された (表1)。採集地点によって捕獲に要した時間数が異なるので、1時間当たりの捕獲個体数を求めたところ、D地点の密度が最も高く107.3個体/時間、もっとも密度が低かったのはA地点で23.0個体/時間であった。

マークして放逐された個体数は、1日目804個体、2日目が1111個体であった。放逐された場所とは異なる場所で再捕獲された個体について、放逐場所と再捕獲場所の直線距離に基づいて平均移動距離を求め表2に示した。ある採集場所でマーク・放逐され、同じ日に別の採集場所で捕獲された個体の平均移動距離は、1日目が1,150m、2日目は750mであった。放逐1日後の平均移動距離は1,000m、放逐2日後の平均移動距離は713mであった。また、観察された最大移動距離は1日目にC地点で放逐さ

れ2日目にA地点で捕獲された個体の2kmであった。

3点法による分析の結果、1日目から2日目の生存率は1.12となり、これ以上の分析はできなかった。そこで、マーク虫が移動している範囲を考え、その中に生活している無マーク虫がマーク虫と同じように捕獲されると仮定して単純な比例式から $Ne = M \cdot N / R$ として、調査地全体のオオクロバエの推定個体数 (Ne) を求めた (表2)。調査地全体のオオクロバエの個体数は1日目が59,550個体、2日目は143,171個体と推定された。1日目と2日目の推定値には2.4倍の違いがあるが、おおよその生息個体数は数万から十数万と考えられる。

D. 考察

本研究によってオオクロバエは数時間のうちに少なくとも1,150m、1日後には最大で2,000mを移動することが明らかになった。また、成虫は1方向にのみ動いているのではなく、活動時間に調査地のあちこちをさかんに飛び回っていると考えられる。このような習性はトリインフルエンザウイルスに感染した野鳥や鶏の糞や死体から効率よくウイルスを取り込み、短時間のうちに広範囲に運ぶことを可能にしていると推察される。

本研究で調査地として選んだ養鶏場は高病原性トリインフルエンザの流行があったため既に1年前から閉鎖され、鶏以外の家畜もまったく飼育されてはいなかった。しかしながら、調査地には数万から十数万と推定されるオオクロバエが生息し活発に活動していた。京都府や大分県九重町でのオオクロバエの採集結果を参考にすると、1時間当たり20~30個体がふつうに観察される密度であると思われる。これに比較すると本調査地のB, C, D, Eにおける密度は数倍高いことがわかる。この結果はオオクロバエがこの調査地のような地形や植生の場所を繁殖地として選好すること示していると考えられる。

E. 結論

オオクロバエは数時間のうちに少なくとも 1,150m, 1 日後には最大で 2,000m を移動することが明らかになった。またマーク虫の動きから日中の活発な採餌活動が推察され、トリインフルエンザウイルスに感染した野鳥や鶏の糞や死体から効率よくウイルスを取り込み、短時間のうちに広範囲に運ぶことが可能であると考えられた。オオクロバエには繁殖に適した地形や植生があり、そのような場所を選好していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

津田良夫(2005)トリインフルエンザの流行地におけるオオクロバエの移動と生息密度. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 札幌.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

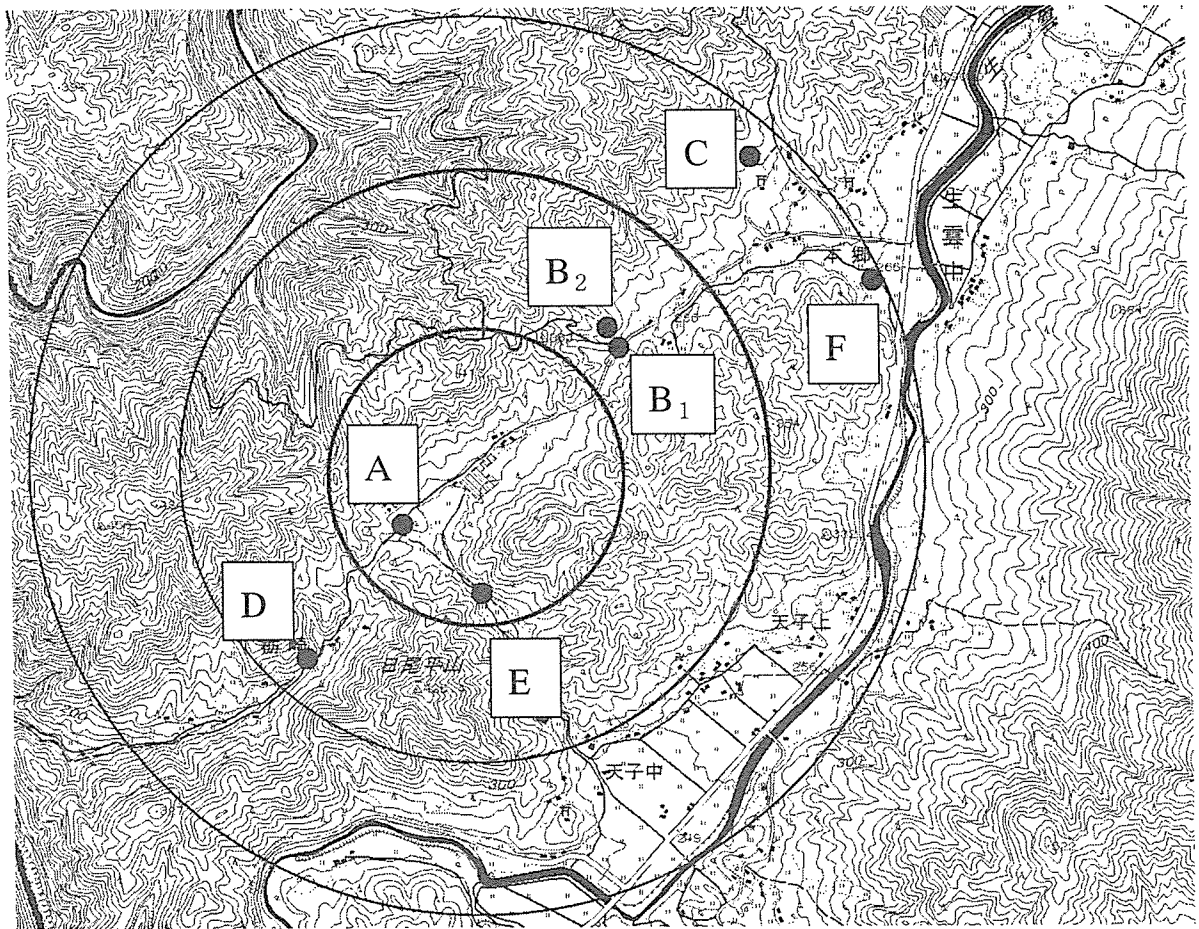


図 1. オオクロバエのマーキング実験を行った山口県阿武郡阿東町生雲中の調査地. A～Fは採集場所の位置を示す.

表 1. 採集地点間の総捕獲個体数とマーク個体の総捕獲数の違い

採集地点	採集場所			総捕獲数	捕獲に要し時間当たマーク個体		
	1日目	2日目	3日目		た総時間	り捕獲数	総捕獲数
A	○	○	○	530	23	23.0	5
B1	○	○	○	442	17	26.0	8
B2	○	○	○	885	17	52.1	11
C	○	○	○	838	17	49.3	6
D	-	-	○	322	3	107.3	4
E	-	○	○	701	11	63.7	6
F	-	-	○	130	5	26.0	2
合計	4	5	7	3,848	93	41.4	42

表 2. 再捕獲個体の平均移動距離

	マーキング中の再捕獲			
	1日目	2日目	放逐1日後	放逐2日後
平均距離	1,150 m	750 m	1,000 m	713 m
個体数*	2	6	17	8
最大距離	1,150 m	1,000 m	2,000 m	1,150 m

*放逐された場所と同じ場所で再捕獲されている個体は計算から除外した.

表 3. Lincoln 指数によって求めたオオクロバエの推定個体数

	1日目放逐	2日目放逐
放逐総数 M	804	1,111
再捕獲総数 R	15	15
無マーク虫総数 N	1,111	1933
推定総個体数 Ne	59,550	143,171