

オオクロバエからのインフルエンザウイルス遺伝子の検出とウイルス伝播におけるオオクロバエの役割に関する考察

研究分担者	小林陸生	国立感染症研究所
研究協力者	津田良夫	国立感染症研究所
	伊澤晴彦	国立感染症研究所
	中口 梓	国立感染症研究所
	星野啓太	国立感染症研究所
	澤邊京子	国立感染症研究所
	金 京純	国立感染症研究所
	林 俊彦	国立感染症研究所
	倉橋 弘	国立感染症研究所
	富田隆史	国立感染症研究所

研究要旨 2004年10月～2007年2月、西日本の4県（山口，福岡，佐賀，宮崎）で採集したオオクロバエ（合計1,887個体，96プール）からのMおよびHA遺伝子の検出を試み，2006年11月に佐賀県西有田町で採集された集団（620個体，31プール供試）の1プールからM遺伝子の断片が検出された。

オオクロバエの飛来個体数の時刻変化と飛来個体数に影響する気象要因に関して過去に実施した11回の野外調査結果から考察を行った。飛来個体数の経時的変化は日射量に依存していると推察された。オオクロバエの飛来個体数と調査日の気象条件について検討したところ，捕獲個体数と風速の間に有意な負の相関関係が認められたが，気温との相関関係は有意ではなかった。

佐賀県西有田町で得られた陽性サンプルの比率からインフルエンザウイルスを体内に保持するオオクロバエの割合を0.0016と仮定すると，2,853個体以上のオオクロバエが鶏に食べられれば0.99の確率でウイルスが鶏に受け渡されると推定された。養鶏場の規模にもよるが鶏舎周辺には数万個体のオオクロバエが飛来していると考えれば，このうちの1割程度（数千個体）が鶏舎に侵入して捕食されるならば，インフルエンザウイルスがオオクロバエから鶏に受け渡される確率が極めて高いと結論した。

A. 研究目的

2004年3月に高病原性トリインフルエンザの流行が起こった京都府船井郡丹波町の養鶏場周辺でハエ類を採集し，体内からのトリインフルエンザウイルスの検出を試みた結果，オオクロバエとケブカクロバエからウイルスが検出された。オオクロバエは(1)冬季に繁殖すること，(2)成虫が鳥の糞や死体等から摂食すること，(3)飛翔力が大きく広範囲を飛び回るこ

と，(4)体のサイズが大きく摂食量が多いことなどの理由から，何らかの形でインフルエンザウイルスの伝播に関わっている可能性があると考えた。

高病原性トリインフルエンザの養鶏場における感染過程に関しては，ウイルスに感染したカモ類が国内に飛来し，これらの感染カモ類が感染源となって養鶏場にウイルスが持ち込まれると考えられている。しかしながら，どのような経路で

ウイルスが持ち込まれるかという具体的な経路に関してはまったく明らかになっていない。カモ以外の野鳥が感染の橋渡しをしているという説もあるが、今シーズンに宮崎県と岡山県で流行が起こった養鶏場では防鳥ネットが使用されており、野鳥と鶏が接触したとは考えられない。

カモ類は種々の垂型のインフルエンザウイルスに感染することが知られており、感染した個体はウイルスを糞便と共に排泄する。カモ類が飛来する秋から冬はオオクロバエの繁殖期であり、mark-release-recapture 実験によって示されたように、この時期のオオクロバエは一日のうちに1キロ以上、恐らく数キロの範囲を飛び回っていると考えられる。オオクロバエは糞便や腐肉などを次々と捜しては摂食をくり返し、その過程で感染したカモの糞便からウイルスを取り込む可能性がある。このようにして体内にウイルスを保持した個体が養鶏場に飛来し、防鳥ネットをかいくぐって鶏舎内部に侵入する。これらの侵入個体が鶏によって捕食されることでウイルスが鶏の体内に取り込まれる。このような感染経路はオオクロバエの習性を考慮すれば、十分ありうる経路であり野外調査によってその可能性を検討することは非常に重要である。

オオクロバエのウイルス伝播における役割を検証する上で、(1)カモ類の糞からオオクロバエがウイルスを取り込んでいるかどうか、(2)鶏がウイルスを保持したオオクロバエを捕食し感染が成立するかどうか、これら2つは最も重要な研究課題である。本研究は特に(1)の課題に関して、2004年から2007年に野外で採集されたオオクロバエを材料として、ハエからのインフルエンザウイルスの検出を行ってウイルス伝播の可能性を検討した。

B. 研究方法

1. オオクロバエの採集：

インフルエンザウイルスの検出に用いたサンプルの採集地を表1にまとめて示

した。(1)および(2)山口県阿武郡阿東町のサンプルは、2003年12月に我国で初めて高病原性トリインフルエンザの流行が起こった養鶏場の跡地で、翌年と2年後に採集されたサンプルである。(3)山口県山口市のサンプルは2005年10月末に福岡市でオオクロバエの飛来が確認された直後に採集されたサンプルである。(8)宮崎県清武町および(9)宮崎県宮崎市のサンプルは、2007年1月に高病原性トリインフルエンザの流行が起こった養鶏場からそれぞれ約500mおよび6kmに位置する溜め池周辺で、養鶏場で鶏の殺処分が終了した1週間後に採集されたサンプルである。(10)宮崎県佐土原町のサンプルは2007年1月に宮崎県新富町で高病原性トリインフルエンザの流行が確認される約1週間前に、隣接する佐土原町で採集されたサンプルである。(4)および(5)福岡県福岡市のサンプルは毎年10月末に多数のオオクロバエが海上より飛来し繁殖することが知られている福岡市内の南公園で採集されたサンプルである。(6)および(7)佐賀県西有田町のサンプルは、2006年11月に韓国で起こった高病原性トリインフルエンザの流行をうけて採集されたサンプルで、朝鮮半島に近く養鶏場が散在している地域である。

採集は魚肉ベイト(鯛)を用い、これに誘引され飛来したオオクロバエを捕獲した。捕獲された個体は個別にマイクロチューブに入れ、冷蔵状態で感染研に輸送した。

2. オオクロバエからのインフルエンザウイルス遺伝子の検出：

オオクロバエは、ホールガラス上で個別に解剖し消化管(そ嚢および腸管)を摘出した。それら消化管サンプルはリン酸緩衝液あるいはMEM培養液を加えたチューブ内に移し、細胞破砕機MM300(QIAGEN)で破砕後、軽く遠心した上清をRNAの抽出に供した。20個体から摘出した消化管を1プールとし、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)によりRNAを抽出、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 (ヘマグルチニン) 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3セットである。一連のすべての工程は安全キャビネットの中で行った。

1) A 型インフルエンザウイルス検出用プライマー

M30f/M264r (f:

TTCTAACCGAGGTCGAAACG/r:

ACAAAGCGTCTACGCTGCAG) (M 遺伝子, 231bp, Saito et al., 投稿準備中)

2) H5 亜型検出用プライマー

H5 515f/H5 1220r (f:

CATACCCAACAATAAAGAGG/ r:

GTGTTCATTTTGTAAATGAT) (HA 遺伝子, 708bp, 感染研 website 参照

<http://idsc.nih.gov/jp/others/topics/flu/RTpccr.html>)

H5 529f/H5 1208r (f:

AAGAGGAGCTACAATAATAC/ r:

TTAATGATCGCGTTGACCTT) (HA 遺伝子, 682bp, Sawabe et al., 2006)

RT 反応は, 48°C で 45 分→94°C 2 分間熱変性させ, 次いで 94°C 1 分→45°C 1 分→72°C 2 分のサイクルを 45 回繰り返した後 72°C 10 分→4°C で保管した。H5 亜型の検出は RT-PCR 後, H5 529f/H5 1208r プライマーセットを用いて nested PCR を行った。反応は, 94°C で 2 分間熱変性させ, 次いで 94°C 30 秒→55°C 30 秒→72°C 1 分のサイクルを 35 回繰り返す, その後 72°C 10 分→4°C で保管した。得られた PCR 産物はすべてダイレクトシーケンス法により PE/ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いて構造解析を行い, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) および GENETYX-WIN ver.8 により配列情報の検索を行った。

3. 採集時の気象条件:

気象庁の観測地点の中から各調査地に最も近い観測地点の気象条件を用い, 採集日の平均気温, 最高気温, 最低気温, 平均風速および日照時間を求め, 平均捕獲個体数との相関関係を調べた。

C. 研究結果

オオクロバエからのインフルエンザウイルス遺伝子の検出:

2004 年 10 月~2007 年 2 月, 西日本の 4 県 (山口, 福岡, 佐賀, 宮崎) で採集したオオクロバエのそれぞれ 20 個体を 1 プールとし, M および HA 遺伝子を検出した。これまでに合計 1,887 個体, 96 プールからウイルス遺伝子の検出を試みたが, 2006 年 11 月に佐賀県西有田町で採集された集団 (620 個体, 31 プール供試) の 1 プールからのみ M 遺伝子の断片が検出された。このクロバエプールでは, H5 遺伝子検出用プライマーでの遺伝子増幅は認められなかったことから, 本ウイルスは H5 亜型ではない A 型インフルエンザウイルスであることが示唆された。事実, 約 230bp の M 遺伝子断片の BLAST 解析結果では, 水禽類由来の H5 以外の亜型インフルエンザ A ウイルスが近縁な種として上位に検索されている。今後, 詳細な亜型タイピングを実施する予定である。

オオクロバエの飛来密度と気象条件に関する検討:

オオクロバエの飛来個体数の時間的変化ならびに採集日の気象条件の時間的変化を 2004 年 10 月 28, 29 日に山口県阿武郡阿東町で行った調査結果を例として図 1 に示した。ハエの飛来は午前 9 時 30 分ごろから認められたが, そのときの気温は 28 日が 4°C, 29 日は 8.9°C といずれも 10°C よりも低かった。オオクロバエの飛来活動は陽射しがあるときに限られているが, 10 月 28 日のように快晴で常に陽が射している日であっても, 飛来個体数は経時的に変化する。これは日射量の経時的変化に反応しているものと思われる。全天日射量が観測されている宮崎市の気象データで冬季 (12 月) の日射量の時刻変化を調べてみると, 日射量は日が射し始める午前 8 時ごろから増え始め, 12 時から 13 時にかけてもっとも多く (平均 1.7MJ/m²) なり, その後減少して夕方 18

時ごろにはゼロになった。オオクロバエの飛来は通常 9 時 30 分ごろから始まり、11 時 30 分から 13 時にかけてもっとも活発に飛来する。その後 15 時を過ぎると飛来数はかなり少なくなる。このように、オオクロバエの飛来活動は気温よりも日照条件、特に日射量に大きく左右される。図 1 の例では風速は 2m/s 以下であり、この程度であればハエの飛来にはほとんど影響ない。

2004 年から 2007 年に各地で実施した調査について 1 時間当たり平均捕獲個体数と調査日の気象条件をまとめて表 2 に示した。日射量を測定している観測地点は限られるので、日射量の代わりに日照時間を示した。平均捕獲個体数と気象条件の相関関係を調べたところ、風速のみが有意な負の相関 ($r = -0.714$) を示した。図 1 と表 2 の結果から考えて平均風速が 2m/s 以上になると捕獲数が少なくなる傾向がある。これに対して平均捕獲個体数と気温あるいは日照時間の相関関係は有意ではなかった。

D. 考察

佐賀県西有田町で採集した 31 サンプル (620 個体) 中 1 サンプルからインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。陽性サンプルはこのサンプルひとつだけであるが、インフルエンザウイルスの伝播におけるオオクロバエの役割を考えるうえで非常に重要な意味を持っている。検出されたウイルスは水禽類由来のウイルスであると考えられるので、今回の結果はカモ類の糞や死体等を摂食しインフルエンザウイルスを取り込んだオオクロバエが 0.0016 ($=1/620$) の割合で存在したことを示唆している。また、同一場所で約 2 ヶ月後に採集したサンプルからは陽性サンプルは得られなかったことから、この 11 月のサンプルで検出されたインフルエンザウイルスはその後これ以上大きな流行には至らなかったと推察される。

カモ類からインフルエンザウイルスを取り込んだオオクロバエが少なくとも

0.0016 の割合で存在しているとすると、N 個体のオオクロバエの中に少なくとも 1 個体のウイルス陽性個体が含まれる確率は、 $1 - (1 - 0.0016)^N$ と表すことができる。この式からウイルス陽性個体が得られる確率が 0.9 および 0.99 となる個体数 N を求めると、1,427 個体および 2,853 個体となる。つまり 620 個体中に 1 個体の割合でインフルエンザウイルスを体内に保持するオオクロバエがいると仮定したとき、このオオクロバエの集団から 1,427 個体が鶏によって摂食されれば 0.9 の確率でインフルエンザウイルスが鶏に受け渡される。さらに、もし 2,853 個体以上のオオクロバエが摂食されれば 0.99 の確率で、つまりほぼ確実にウイルスを保持するオオクロバエが鶏によって食べられると推定される。数千から数万羽の鶏を飼育する養鶏場を考えれば、数千個体のオオクロバエを鶏が捕食することは普通に起こりうることと思われる。

オオクロバエの飛来密度は表 2 に示すように、少ない場所で 1 時間当たり 6 個体、多い場所では 60 個体ほどである。日当たりの良い日の活動時間がおおよそ 5 時間 (9 時~14 時) であるとする、少ない場所で 30 個体、多い場所で 300 個体が飛来する。オオクロバエの飛来数が多い場所の条件としては、(1)日当たりがよいこと、(2)風が強くないこと (2m/s 以下)、が挙げられる。具体的には東南あるいは南に面している樹木の繁った緩やかな斜面である。ある養鶏場を考え、オオクロバエが多数飛来する場所が 10 ヶ所 (東南あるいは南に面している緩やかな斜面が 100m 程度) あれば飛来総数は 3,000 個体に達するだろう。これらの飛来したオオクロバエがすべて鶏に食べられるような状況であれば、ほぼ確実に鶏がインフルエンザウイルスを体内に取り込むと考えられる。しかしながら、養鶏場に飛来したオオクロバエのどれほどが鶏舎内部に侵入し鶏に食べられるかについては現在のところまったく情報が無い。調査地は

異なるが、山口県阿武郡阿東町で実施したオオクロバエの mark-release-recapture 実験で、調査地域に生息していたオオクロバエの個体数は約 10 万個体であると推定されている。養鶏場の規模にもよるが鶏舎周辺には毎日数万個体のオオクロバエが飛来していると考えれば、このうちの 1 割程度（数千個体）が鶏舎に侵入して捕食されるならば、インフルエンザウイルスがオオクロバエから鶏に受け渡される確率が極めて高いと結論できるだろう。

オオクロバエが餌と共に取り込んだインフルエンザウイルスは、取り込まれてから 24 時間以内であればその感染力（ウイルス力価）は保たれることがこれまでの感染実験で明らかになっている。オオクロバエの活動が日照条件に依存しており、天候が好適な場合、一日の活動時間が 5 時間程度であることを考えると、5 時間の間にカモ類の糞などからウイルスを体内に取り込んだ個体が養鶏場に飛来できるような状況にないと、オオクロバエがウイルスを運搬する可能性は低くなる。オオクロバエの移動能力については、数時間で 1~2km を移動できることが mark-release-recapture 実験から明らかになっているので、養鶏場の周囲数キロの範囲でオオクロバエがカモ類の糞を利用できる環境であれば、ハエによるウイルスの運搬は起こりうるだろう。

オオクロバエによるインフルエンザウイルス伝播の可能性を検討するためには今後さらに、鶏舎内部に侵入したオオクロバエのどのくらいの数が鶏に捕食されるか、またインフルエンザウイルスを保持したオオクロバエを何個体捕食したら鶏が感染するかに関して研究する必要がある。

E. 結論

2004 年 10 月~2007 年 2 月、西日本の 4 県（山口、福岡、佐賀、宮崎）で採集したオオクロバエからの M および HA 遺伝

子の検出を試みた。合計 1,887 個体、96 プールからウイルス遺伝子の検出を試み、2006 年 11 月に佐賀県西有田町で採集された集団（620 個体、31 プール供試）の 1 プールから M 遺伝子の断片が検出された。過去に実施した 11 回の野外調査に関して、オオクロバエの飛来密度と調査日の気象条件について検討したところ、捕獲個体数と風速の間に有意な負の相関関係が認められたが、気温との相関関係は有意ではなかった。

佐賀県西有田町で得られた陽性サンプルの比率から、インフルエンザウイルスを体内に保持するオオクロバエの割合を 0.0016 と仮定すると、2,853 個体以上のオオクロバエが鶏に食べられれば 0.99 の確率でウイルスが鶏に受け渡されると推定された。養鶏場の規模にもよるが鶏舎周辺には数万個体のオオクロバエが飛来していると考えれば、このうちの 1 割程度（数千個体）が鶏舎に侵入して捕食されるならば、インフルエンザウイルスがオオクロバエから鶏に受け渡される確率が極めて高いと結論できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H. Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., Yamada, A. and Kobayashi, M. (2006) Detection 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.*, 75(2). 327-332.

2) 倉橋弘, 津田良夫(2005) 日本の北と南におけるオオクロバエの記録. はなあぶ 20: 17-18.

2. 学会発表

1) Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y.,

Kurahashi, H. and Kobayashi, M.(2007)
Isolation of highly pathogenic H5N1
influenza virus from blow flies and its
ability of virus transmission. The 41th
Joint Conference on Parasitic Diseases,
The Japan-United States Cooperative
Medical Science Program. 東京.

2)澤邊京子, 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴
彦, 倉橋弘, 主藤千枝子, 棚林清, 堀田明豊,
山田章雄, 小林睦生(2006) 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. 第 58 回日本衛生動物
学会大会. 長崎市.

3)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
市.

4)澤邊京子(2005) クロバエ類からの高病
原性トリインフルエンザウイルスの検出と
分離. 第 57 回日本衛生動物学会大会. 札幌
市.

5)倉橋 弘(2005) 高病原性トリインフル
エンザ流行にクロバエ類がかかわっていた
可能性はあるのか? 第 57 回日本衛生動物
学会大会. 札幌市.

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

表 1. 野外より採集されたオオクロバエからの A/H5 インフルエンザウイルス遺伝子の検出結果

採集地	採集日	供試虫数	プール数	陽性プール数		
				HA	HA-nested	M
(1)山口県阿武郡阿東町	2004年10月29日	100	5	0	0	0
(2)山口県阿武郡阿東町	2005年10月25日	60	3	0	0	0
(3)山口県山口市	2005年10月30日	18	1	0	0	0
(4)福岡県福岡市	2005年10月31日	100	5	0	0	0
(5)福岡県福岡市	2006年11月29日	340	17	0	0	0
(6)佐賀県西有田町	2006年11月30日	620	31	0	0	1
(7)佐賀県西有田町	2007年2月7日	319	16	0	0	0
(8)宮崎県清武町	2007年1月27日	50	3	0	0	0
(9)宮崎県宮崎市	2007年1月27日	24	2	0	0	0
(10)宮崎県佐土原町	2007年1月26日	256	13	0	0	0
合計		1,887	96	0	0	1

20 個体のオオクロバエより得られた素囊および中腸を 1 プールとし、RT-PCR および nested-PCR 法によって HA および M 遺伝子の検出を行った。

表 2. 2004 年から 2007 年に実施したオオクロバエの野外調査で捕獲された 1 時間当たりの平均個体数と調査日の気象条件

調査日	調査地	平均捕獲数/時間	気温			風速 m/s	日照 時間
			平均	最高	最低		
2004年10月28日	山口県阿武郡阿東町	28.6	8.2	18	2.2	0.5	8.4
2004年10月29日	山口県阿武郡阿東町	47.8	11.5	20.6	3.1	0.6	5.3
2004年11月01日	京都府船井郡丹波町	60.4	16	19.6	12	0.6	0.5
2006年11月29日	福岡県福岡市	24.2	12.6	14.6	10.1	2.6	4.5
2006年11月30日	佐賀県西有田町	63.8	9.1	13.8	5.1	1.4	7.8
2006年11月30日	佐賀県西有田町	61.5	9.1	13.8	5.1	1.4	7.8
2007年01月26日	宮崎県佐土原(山脚部)	36.5	9	15.7	3.5	5.6	5
2007年01月26日	宮崎県佐土原(河口部)	11.4	9	15.7	3.5	5.6	5
2007年01月27日	宮崎県清武町	6.6	9	13.1	5.9	4.5	7.5
2007年01月27日	宮崎県宮崎市	6.2	9	13.1	5.9	4.5	7.5
2007年02月07日	佐賀県西有田町	65.0	11.2	18.6	5	1.2	7.2
平均捕獲数との相関係数			0.387	0.439	0.125	-0.714	-0.142

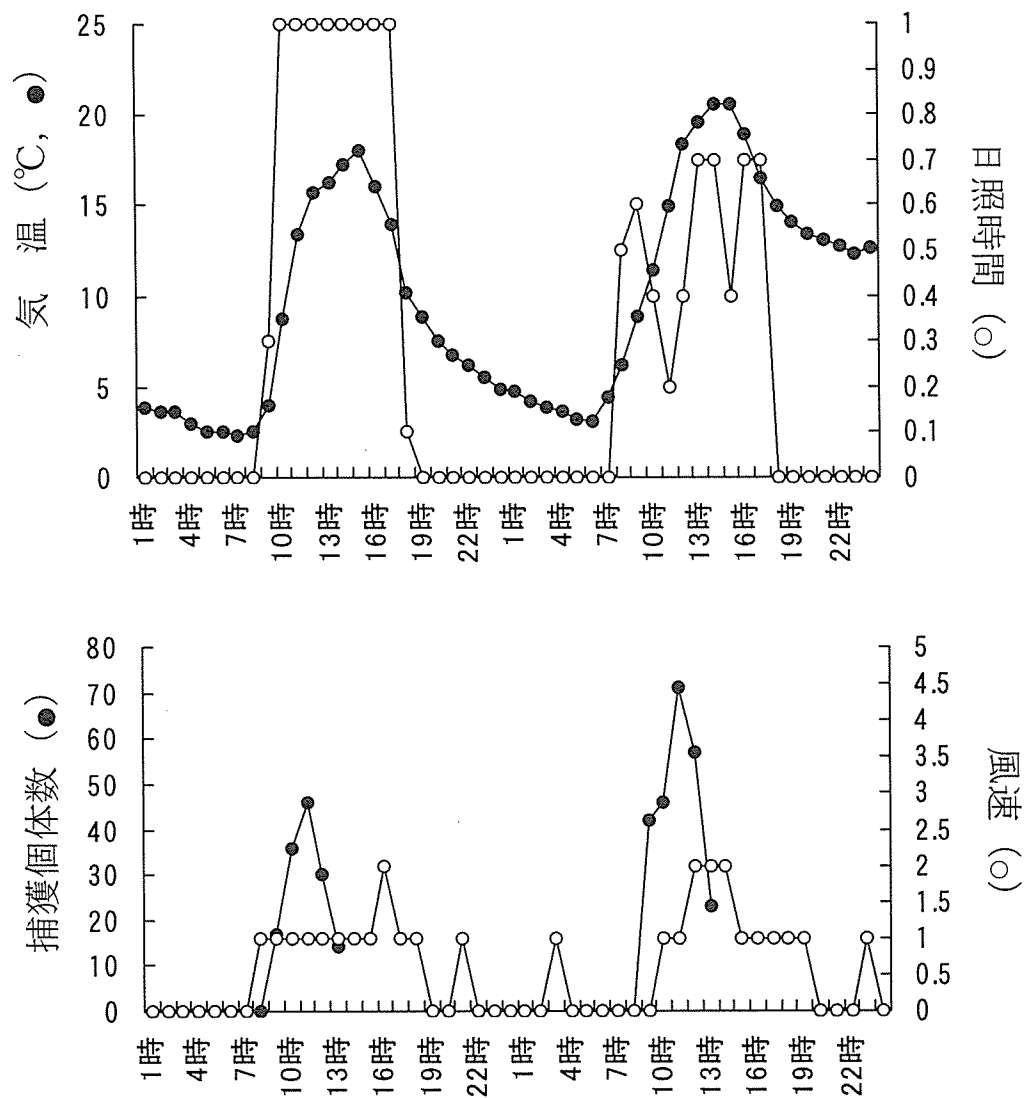


図1. 山口県阿武郡阿東町で2004年10月28-29日に捕獲したオオクロボエの個体数と気象条件の時間的変化.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

「新型インフルエンザへの事前準備と大流行発生時の緊急対応計画に関する研究」

「新型ウイルスの感染病理機構と予防法・治療法の開発」

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

研究要旨

アジアに端を発した家禽類での高病原性トリインフルエンザ H5N1 は本邦を含めたアジア諸国に広がり中東を経てヨーロッパ、アフリカまへの広がりを見せている。また、ヒトでの感染例も増え続けておりその致死率の高さからヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスへ発展したときの対応が急務である。本研究において 2004 年ベトナムにおいてヒト死亡例から分離された強毒型 H5N1 株 A/VN/1194/2004 を用い哺乳類に対する病原性をマウス感染モデルを用い自然免疫の活性化による感染防御の試みと Natural Killer T 細胞の活性化を利用した経鼻粘膜ワクチンによる感染防御を検討した。H5N1 インフルエンザウイルスよりリバーシジェネティック法で弱毒化されたワクチン株を用いホルマリン不活化全粒子ワクチンの有効性と交叉防御能を調べた。自然免疫誘導物質としては Chitinmicroparticles を用い感染を有意に抑制し生存率を改善させた。また粘膜アジュバントとして Natural Killer T 細胞の特異的リガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) を用いた。同ワクチンの経鼻接種により完全防御に必要な鼻腔内 IgA, 血中 IgG が誘導された。またこの免疫法により免疫されたマウスは抗原性の異なるインフルエンザウイルスに対しても交叉防御がある事がしめされた。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパ、アフリカにまで広がりヒトに感染した場合に高い致死率をしめしている。本ウイルスがヒトからヒトへ伝播する新型インフルエンザの元となる新型インフルエンザ出現の脅威となって

いる。現在アジアを発端として流行している高病原性鳥インフルエンザの哺乳類での病原性を解析しその有効な予防法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

材料と方法：

ウイルス株及びワクチン株

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 (A/VN/1194/2004) を用いてマウス感染実験を行った。また交叉防御の実験では A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N1), B/Ibaraki のスプリットワクチンを用いた。H5N1 のワクチン株としてはリバーシジェネティクス法により A/VN/1194/2004 (H5N1) の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

ウイルス感染

A/VN/1194/2004 株ウイルスを 1,000pfu 及び 10,000pfu を鼻腔内に接種した。交叉防御の実験においては A/PR8 (H1N1) ウイルスを 1000pfu を経鼻接種した。感染実験は、全て国立感染症研究所 BSL2 及び BSL3 動物実験施設でおこなった。

アジュバントの調整

経鼻粘膜ワクチンのアジュバントとして Natural Killer T 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) を用いた。

自然免疫賦活物質

自然免疫を賦活化する物質として Chitinmicroparticle を用いた。

マウス

免疫実験及び感染実験に用いたマウスは 6 週齢の BALB/c マウス (メス) 及び NKT 細胞欠損の J α 281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用いた。

免疫方法

7 週齢の BALB/c マウス (雌) を用いた。1 群 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 0.1 ~ 1 μ g のワクチンを 0.1 ~ 10 μ g の poly(I:C) アジュバント、と共に経鼻投与した。4 週後に、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その 2 週後に 5 匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織 (NALT) および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

ELISA アッセイ

遺伝子を改変した H5HA に対する IgA および IgG 抗体価の測定は、ELISA にておこなった。免疫に用いたワクチン抗原を ELISA プレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgA (α 鎖) または IgG (γ 鎖) を反応させた。アルカリホスファターゼ-ストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ吸光度を測定した。あらかじめ精製した H5-HA 反応性の IgA と IgG を任意の単位 (160U) のスタンダードとして用い、2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価

を表現した。

病理

攻撃感染後 7 日目のマウスについて、脳、鼻腔、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸の病理学的変化を観察した。各組織の切片を HE 染色および A 型ウイルスの NP に対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色をおこなった。

結果

1、自然免疫誘導による高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) の感染予防

高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) を粘膜での自然免疫の誘導により予防する試みとして Chitinmicroparticles を粘膜投与しその予防効果を BALB/c マウスを用いて調べた。Chitinmicroparticles をウイルス感染の 1 日前、6 時間前に 2 回 100 μ g 経鼻投与し、その後、2004 年ベトナムのヒト感染例から分離された高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 A/VN/1194/2004 を感染させ経時的にウイルスの広がりを追跡し各臓器でのウイルス価と病理学的な検索を行った。感染には最初の感染を鼻腔に局限した感染とする為に片鼻 2 μ l とした。Chitinmicroparticles 投与群、非投与群におけるウイルスの広がりがみられた各臓器でのウイルス価の変化を図 1 に示す。ウイルス接種部位である鼻腔において

ウイルスは感染 5 日目をピークに、鼻腔洗浄液 1ml に対し 10^4 pfu まで上昇し局所での感染は 10 日目までに減少していった。Chitinmicroparticles を投与した群においては感染 3 日目では鼻腔洗浄液中にウイルスは同定されず、5 日目に 3 匹中 1 匹で 10^2 pfu 同定されたのみであった。また肺では非投与群で感染 8 日目に降全てのマウスでウイルスが同定されたが、Chitinmicroparticles 投与群では感染 3 日目に 3 匹中 1 匹で僅かに認められたのみでその後は認められていない。また頸部リンパ節においてもウイルスの増殖が認められなかった。以上の結果から、Chitinmicroparticles の粘膜投与により有意にウイルス感染を予防出来る事が明らかとなった。この現象のメカニズムとして考えられるのは Chitinmicroparticles の粘膜投与により Natural Killer (NK) 細胞の活性化と誘導が知られており、その作用によるものと考えられる。

2、 α -galactosylceramide (α -GalCer) 併用経鼻ワクチンによる感染防御

α -GalCer のアジュバント作用の特異性を調べる為にマウスは野生株の BALB/c マウスと NKT 細胞欠損の J α 281 遺伝子欠損マウス (NKT KO) を用い比較した。ワクチンとアジュバントを 2 週間間隔で 2 回経鼻接種しその後の鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA 抗体濃度及び血清中の IgG 抗体濃度、チャ

レンジ後の鼻腔洗浄液中のウイルス価および生存率を図2に示す。野性株のマウスにおいては α -GalCer及びその誘導体をアジュバントに用いた時鼻腔洗浄液中にPR-8特異的分泌型IgA抗体および血中にIgG抗体が誘導され攻撃感染後のウイルス価が有意に減少した。一方NKT欠損マウスにおいてはIgA及びIgG抗体の誘導はまったく見られず、また攻撃感染後のウイルスの減少も見られなかった。 α -GalCerのアジュバント作用がNKT細胞特異的であることが示された。コントロールに用いたCTBをアジュバントに用いた群ではNKT細胞の欠損に関わらず抗体応答と感染防御が認められた。CTBと α -GalCerのアジュバント作用が別のメカニズムによる事が示された。

3. α -GalCer併用経鼻インフルエンザワクチンによる交差防御

NKT細胞を刺激することにより得られる粘膜免疫のインフルエンザウイルス感染に対する交差防御能を調べた。ワクチンとしてA/PR8(H1N1), A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou(H3N2), B/Ibarakiのスプリットワクチンを用いた。ワクチン1 μ gと α -GalCer2 μ gを3週間おきに2回経鼻接種し、最終免疫より2週間後にA/PR8(H1N1)インフルエンザウイルスを感染させ防御効果及びA/PR8(H1N1)に反応する鼻腔洗浄液中

の分泌型IgA抗体価、血中のIgG価の測定を行った。結果を図3に示す。攻撃感染を行ったA/PR8(H1N1)ウイルスと同じ亜型に属するA/Yamagata(H1N1)、および亜型の異なるA/Guizhou(H3N2)のワクチンを用いた時鼻腔洗浄液中にA/PR8(H1N1)に交叉反応する分泌型IgAが有意に上昇した。また攻撃感染に対し同じ亜型であるA/Yamagata(H1N1)のワクチン接種群では体重減少も見られず100%の生存率であった。亜型の異なるA/Guizhou(H3N2)ワクチンを接種した群では体重減少が認められ生存率は40%であった。B/Ibarakiワクチン接種群、非免疫群では全てのマウスが死亡した。同じ亜型内では抗原性の異なる株でも交叉防御が可能であり、亜型が異なってもA型内であれば部分防御が可能であることが示された。

3. 高病原性鳥インフルエンザ経鼻不活化ワクチンによる交差防御

高病原性鳥インフルエンザウイルスによる感染を防御する目的でアジュバント併用経鼻不活化ワクチンによる感染防御を試みた。ワクチンとしてリバーズジェネティクス法によりA/VN/1194/2004(H5N1)のHA遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン(NIBRG14)株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを用いた。 α -galactosylceramide(α

-GalCer)及びその誘導体の粘膜アジュバント作用を調べる目的で A/PR8(H1N1)のスプリットワクチンを用いた。アジュバントには Natural Killer T 細胞のリガンドとして知られる

α -galactosylceramide (α -GalCer) R0 及びその誘導体 R8 を用いた。

A/Vietnam (H5N1)由来の NIBRG14 全粒子不活化ワクチンをワクチン単独および

α -GalCer と共に経鼻接種しその後の鼻腔洗浄液中の A/Vietnam (H5N1) 特異的分泌型 IgA 抗体および血中の IgG 抗体を調べた。結果を図 4 に示す。図に示す如く α -GalCer 併用群において非併用群に比べ鼻腔洗浄液中の IgA 量が 3 倍に増加し A/Vietnam (H5N1) ウイルスによる攻撃感染に対し、5 匹中 4 匹では感染の完全防御、1 匹で鼻腔中にウイルスを認めたがウイルス価はコントロールと比較し 100 分の 1 以下で生存は 100%であった。 α -GalCer 非併用群では 5 匹中完全防御は 2 匹で生存率は 90%であった。

また、 α -GalCer 併用経鼻ワクチンによる交叉防御能を調べる為に抗原性の異なる H5N1 (A/HK/483/97) 株による攻撃感染実験を行った(図 4)。アジュバントを用いないワクチンのみの群では非免疫群と同様に全てのマウスが死亡したが α -GalCer をアジュバントとして併用したグループにおいては 100%の生存が確認された。 α -GalCer 併用 H5N1 経鼻不活化全粒子ワクチン接種により流行年が 7 年違い抗原性の異なるウイルス

に対し交叉防御が示された。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

D. 考察

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染予防を目指し、自然免疫の誘導による感染予防と Natural Killer T (NKT) 細胞のリガンドである α -GalCer をアジュバントに用いた経鼻ワクチンによる感染防御の研究を行った。まず、自然免疫を利用した感染防御には Chitinmicropartilces を用い、感染局所および、その広がりを見せる臓器におけるウイルス価を大きく減少させた。これは粘膜及び近傍のリンパ節に誘導される Natural Killer 細胞が働いていると考えられる。また、Natural killer T (NKT) 細胞のリガンドで刺激物質である α -GalCer をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 IgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導され交叉防御能が確認された。またそれは高病原性鳥インフルエンザに対しても有効な方法であった。新型インフルエンザに備えたワクチン開発において最も重要な事は流行が起ってからでないとその流行株を種にしたワクチンを作製できない事である。流行が起ってからではワクチンが行き渡るまでに時間がかかり手遅れになる可能性もある。そこでワ

クチン株だけでなくある程度の交叉防御能をもつワクチン法の開発が急務である。交叉防御能をもつワクチンを接種しておくことと流行株と必ずしも抗原性が一致しない場合でもある程度の防御が可能である。今回我々が行った研究はその可能性を示唆する結果である。アジュバントと共にワクチンを経鼻接種することにより交叉防御能を有する分泌型 IgA が誘導され、同じ亜型内の抗原性の異なるウイルスの致死感染に対しても 100%の生存率が示された。また高病原性鳥インフルエンザに対してもワクチン株と抗原性の異なる A/HongKong/483/H5N1 に対して有効であった。経鼻ワクチン接種によって交叉防御能を持つ IgA は鼻腔のみでなく全身の粘膜に分泌される事が知られている。高病原性鳥インフルエンザはその感染が呼吸器に留まらず、消化管を含めた全身にその感染が広がる可能性が高い。そういう意味でも粘膜経由の免疫法は特に高病原性鳥インフルエンザに対して有効であると考えられる。

E. 結論

高病原性インフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルで自然免疫誘導による感染防御の可能性を示した。更にアジュバント併用経鼻 H5N1 ワクチンの有効性を示してきた。ワクチンの経鼻投与による粘膜免疫誘導が特に高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の病態において交叉防御の観点から有効である事が示された。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. **J Med Virol**, 2006 78:954-963.
2. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Takatsugu-Yokota Y., Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology** 2006 Aug;20(8):1329-31. 2006 May 5; [Epub ahead of print].
3. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. **Microbes and Infection**. 2006 Sep;8(11):2647-56. 2006 Aug 8; [Epub ahead of print]
4. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H*, Intranasal

- administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. **Microbes and Infection** 2006 Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub ahead of print]
5. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infections in experimental animals. **Adv Exp Med Biol.** 2006;581:515-8.
 6. Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. **Adv Exp Med Biol.** 2006;581:593-6.
 2. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 マウス、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
 3. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
 4. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染抑制効果 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
 5. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋

学会発表

1. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 10 回日本ワクチン学会学術集会 平成 18 年 10 月 21 日-22 日 大阪
- H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

図1 Chitinmicroparticles (CMP)による高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の感染予防

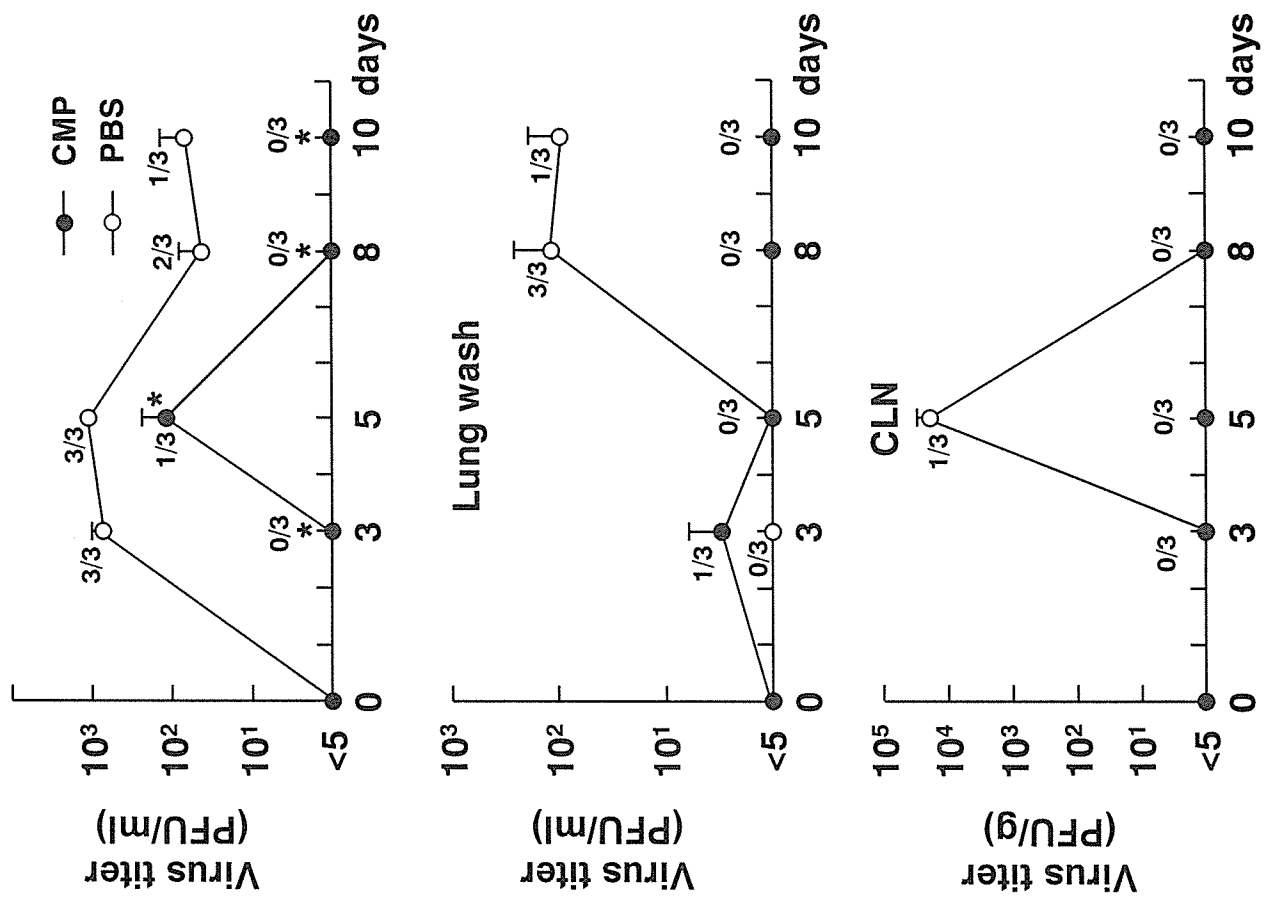
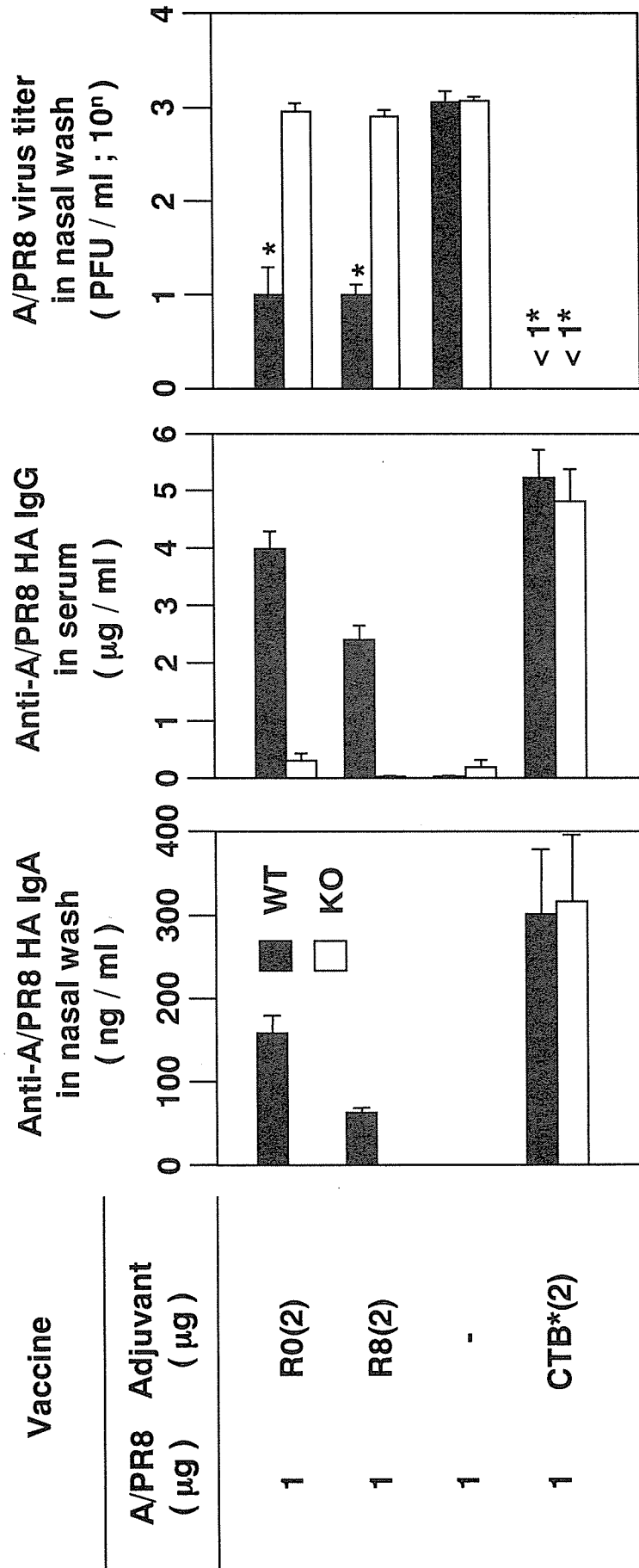


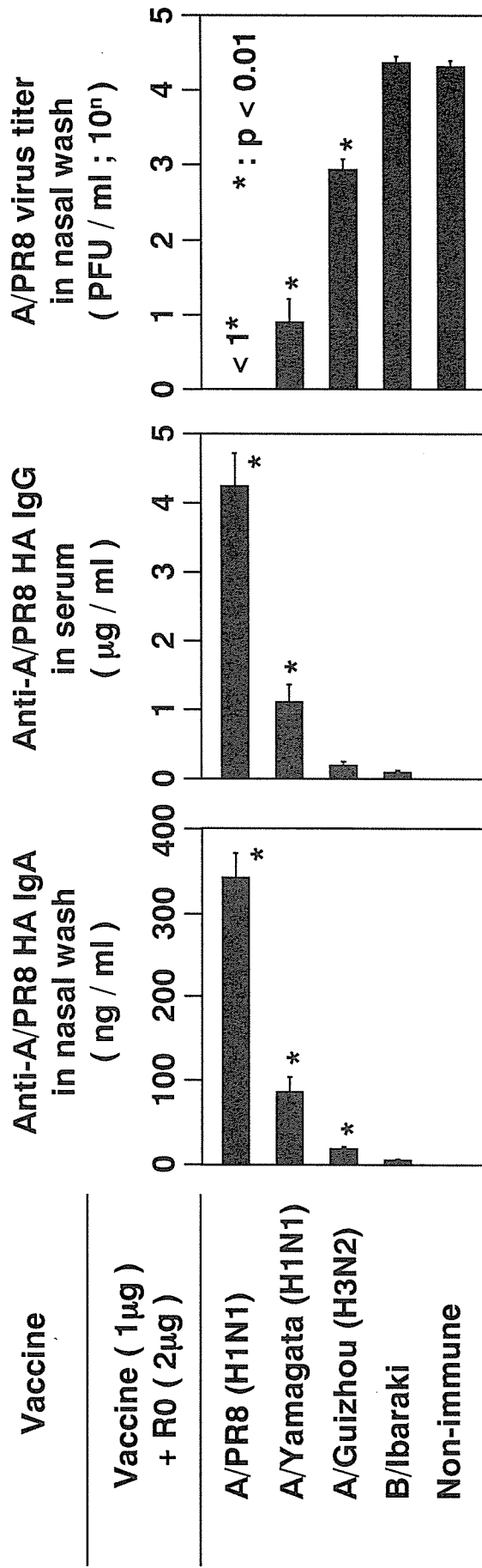
図2 α -GalCerを粘膜アジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンによる感染防御作用はNatural Killer T (NKT)細胞特異的である。



R0: α -GalCer
R8: α -GalCer誘導体

図3 α -GalCer併用経鼻インフルエンザワクチンによる交叉防御能

A



B

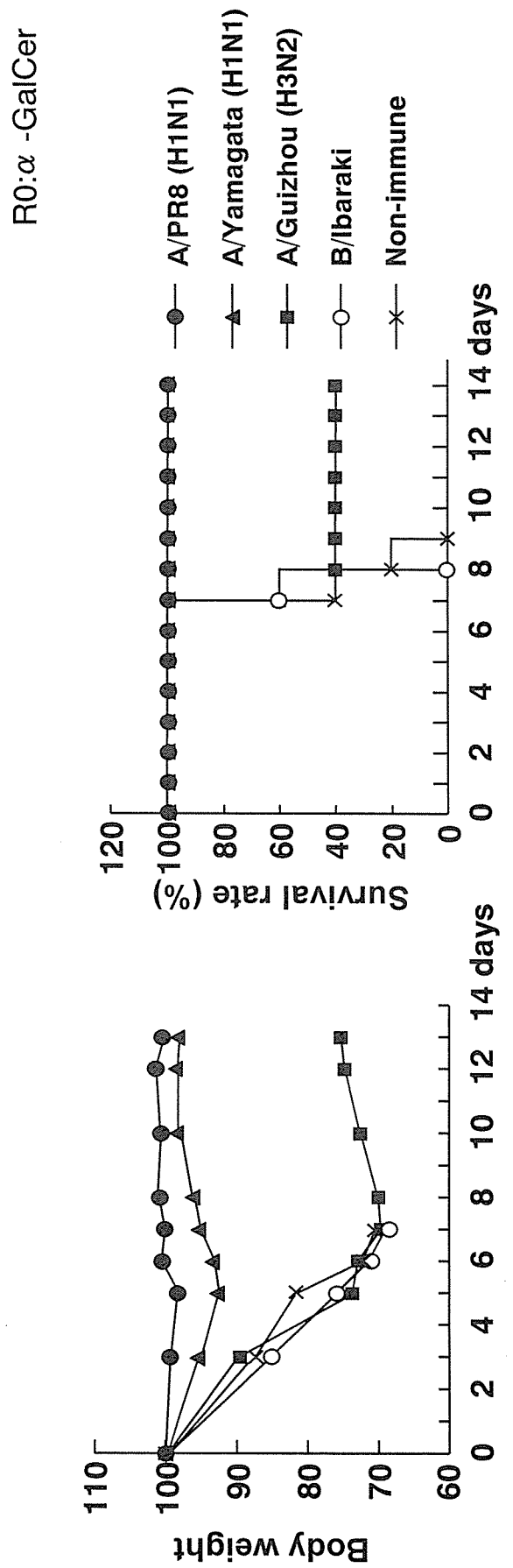
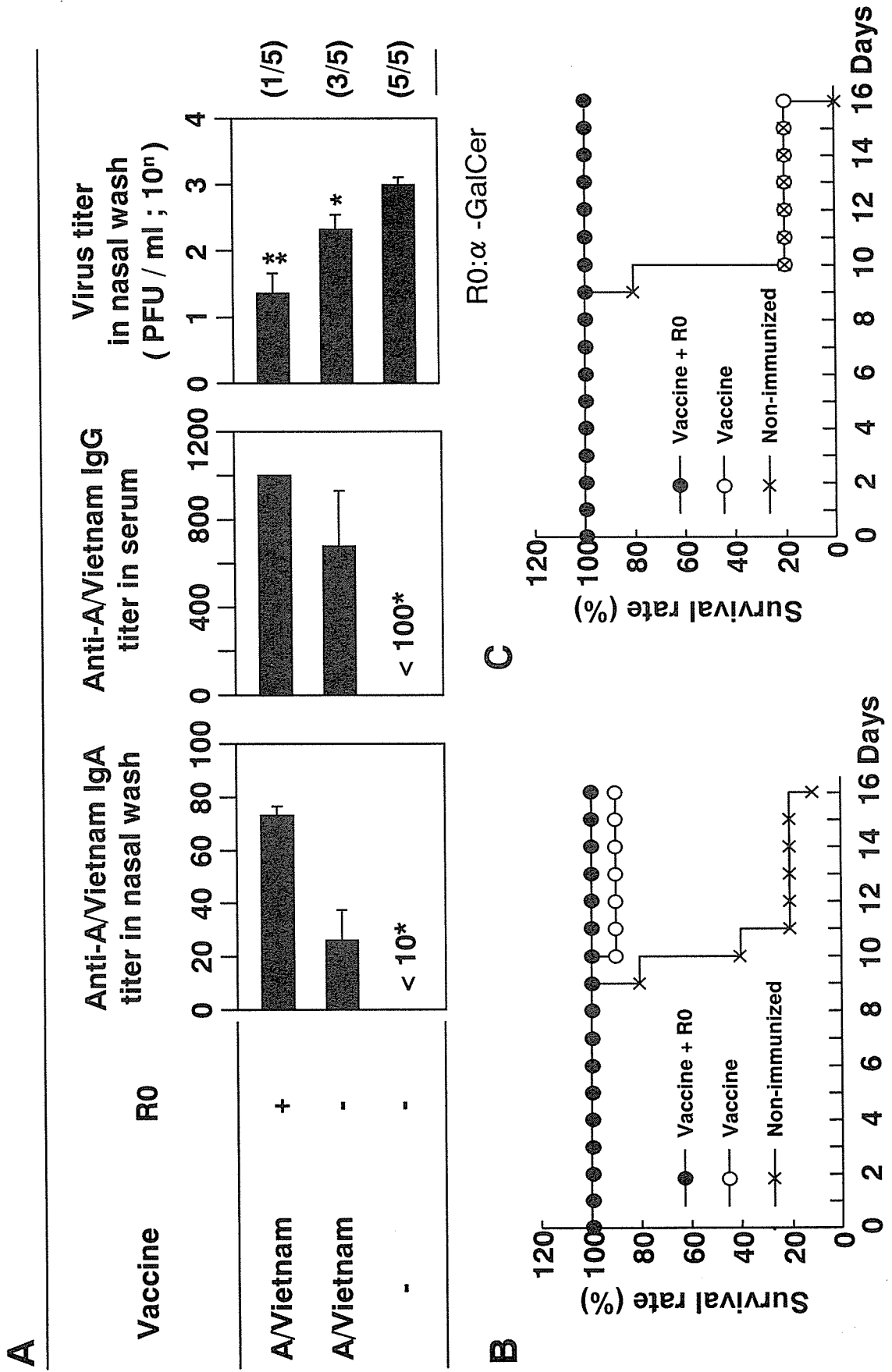


図4 α -GalCer併用経鼻インフルエンザワクチンによる高病原性鳥インフルエンザの感染防御
H5N1 challenge (A) A/Vietnam (B) A/Vietnam (C) HongKong/483



平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

クレード 1 およびクレード 2 の H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを検出で
きる診断系の開発

分担研究者 小田切孝人 国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室室長

協力研究者 影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、小淵正次、板村繁之
(国立感染症研究所ウイルス第 3 部第 1 室)

研究要旨 2005 年後半から H5N1 高病原性鳥インフルエンザ流行株は抗原的にも遺伝的にも 2 つのクレードに分類され、2006 年からはクレード 2 に属する流行株はさらに 3 つのサブクレードに細分されるようになった。このことから、国家備蓄ワクチンとして製造が進められているワクチン株の見直しはもとより、診断キットや遺伝子検出検査系の見直し及びプライマー等の改良が必要となってきた。本研究では、これら異なるクレードおよびサブクレードに分類される全ての H5N1 流行株を高感度に捉えることができる遺伝子検出検査系を開発した。

A. 研究目的

東アジア諸国の家禽で流行が始まった H5N1 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1-HPAI) は、3 年が経過した現在ではユーラシア大陸全域に広がり中国、ロシア、モンゴル、中東、ヨーロッパ、アフリカまで流行が波及した。東南アジアなど多くの国では家禽は養鶏場のように密集飼育されているものは少なく、大多数は裏庭飼育であり、このため H5N1-HPAI ウイルスの蔓延規模を正確に把握することは不可能である。また、H5N1-HPAI ウイルスはもはや家禽に定着してしまっていることから、本ウイルスによる流行を制御し封じ込めることは不可能となっている。

一方、ヒトでの感染例も家禽での流行と並行して増加の一途をたどり、現時点で 12 カ国 277 人の感染例と 167 名の死亡が確認されている。これら感染者の多くは依然として東南アジア諸国に多く、この地域が H5N1-HPAI に由来する新型イ

ンフルエンザの発生源となる可能性が懸念される。

感染者から分離されるウイルスは、未だに鳥型の性状を維持しており、人から人への感染は今のところ家族内感染に限定され、効率的なヒト-ヒト感染は報告されていない。一方、H5N1 流行株は 2005 年後半からは抗原的にも遺伝的にも複数の異なるグループに分かれてきている。さらに、2006 年からはクレード 2 に入る H5N1 ウイルスは少なくとも 3 つのサブクレードに分岐し、現在ではこれらクレード 2 ウイルスが世界的な流行の主流となっている。

2007 年からは中国南部で主に流行していたクレード 2.3 の H5N1 ウイルスがクレード 1 ウイルスが主流であった東南アジア諸国にも蔓延し始め、同一地域で異なる H5N1 ウイルスが共存するようになってきた。

このことは、これまで特定のクレードのウイルスを高感度に捉えるプライマー