

*The First China-Japan-Korea Forum
on Communicable Disease Control and Prevention*

*Influenza Surveillance and
Preparedness for Pandemic, Japan*

**Nobuhiko Okabe MD, PhD
Infectious Disease Surveillance Center
National Institute of Infectious Diseases**

Tokyo, Japan

22-23 Nov. 2007, Beijing, China

The 110th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society

**International Symposium
– Influenza Pandemic in Children –
Present Situation on Avian Influenza
and Pandemic Preparedness
in Japan**

**Nobuhiko Okabe MD, PhD
Infectious Disease Surveillance Center
National Institute of Infectious Diseases
Tokyo, Japan
20 April 2007**

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)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所免疫部)
	小林 和夫	(国立感染症研究所免疫部)
	小田切 孝人	(国立感染症研究所ウイルス第3部)
	田代 真人	(国立感染症研究所ウイルス第3部)

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、血清抗ヘマグルチニン（HA）抗体、あるいは抗ノイラミニダーゼ（NA）抗体が主要な感染防御因子であることを昨年度までに明らかにした。本年度の研究では、抗HA抗体と抗NA抗体の感染防御能を比較するため、NIBRG-14 ワクチンの抗血清から抗HA / NA抗体を除去した後、先天性リンパ球欠損（scid）マウスに移入した。すると、非除去血清に比べて、抗HA抗体を除去した血清と抗NA抗体を除去した血清の双方で強毒H5N1株の攻撃実験に対する感染防御能の低下が観察されたことから、NIBRG-14 ワクチンが惹起する感染防御効果は、抗HA抗体と抗NA抗体の両者に依存する可能性が示唆された。

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活性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。

(2) ELISPOT 法による抗体産生細胞の頻度測定
組換え HA、NA 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骨髓細胞を 2 時間培養した後、アルカリフォスファターゼ標識した抗マウス IgG1 抗体を加え、HA、NA 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。

(3) ELISA による HA、NA 特異的抗体価の測定
バキュロウイルス発現系にて NIBRG-14 と PR8 の組換え HA ならびに NA タンパクを作製した。組換え HA、NA 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、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス 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、ユニット値して換算した。

(4) 抗血清に含まれる抗 HA / NA 抗体の除去
組換え HA、NA タンパクを TALON 樹脂に結合させたカラムを作製し、これに抗血清を通過させて抗 HA 抗体や抗 NA 抗体を除去した。非除去血清として、組換えタンパクを結合させてない TALON 樹脂カラムに通した血清を使用した。

(5) 強毒 H5N1 株による攻撃実験
抗体を除去した血清、あるいは非除去血清を 200 μ l ずつ CB17-scid マウスの静脈に注入した。移入した scid マウスに 5 LD₅₀ の強毒ベトナム株 (A/VN/JP1203/04) を経鼻感染させ、3 週間にわたり生存率を観察した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。

C. 研究結果

(1) NIBRG-14 ワクチンの抗血清中に含まれる抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の濃度の比較

昨年度の研究結果から、NIBRG-14 ワクチンの抗

血清中には、他のサブタイプの不活化全粒子とほぼ同濃度の抗 HA 抗体が含まれることを見いだした。本年度の研究では、NIBRG-14 ワクチンの抗血清中に含まれる抗 NA 抗体の濃度を調べるため、バキュロウイルス発現系にて NIBRG-14 の組換え NA タンパク (rHA) を作製し、rHA と rNA に特異的な IgG1 抗体価を ELISA 法にて比較した。すると、NIBRG-14 ワクチンを接種したマウス抗血清には、抗 HA 抗体の約 7 分の 1 の濃度で抗 NA 抗体が含まれていることが明らかとなった (図 1 左)。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、血清抗体価と同様に、抗 NA 抗体産生細胞数は抗 HA 抗体産生細胞数の約 6 分の 1 であることが判明した。(図 1 右)。

(2) 抗血清に含まれる抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の除去

インフルエンザウイルスに対する防御反応において、抗 HA 抗体は感染そのものを阻害し最も効率的にウイルスを排除する一方で、抗 NA 抗体はウイルスの拡散を防ぎ、症状の軽減に寄与すると推察されている。近年、DNA ワクチン等の手法により、NA に対する抗体が産生されたマウスでは、強毒 H5N1 ウイルス感染に対する生存率が増加する例が報告されている。そこで、NIBRG-14 ワクチンが産生誘導する抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の感染防御能を比較するため、HA タンパクを結合したカラムと NA タンパクを結合したカラムを作製し、ここに抗血清を添加することによって、抗 HA 抗体除去血清、抗 NA 抗体除去血清、さらには抗 HA+NA 抗体除去血清を作製した。各抗体の除去効率を確認するため、カラムを通した血清に含まれる抗 HA 抗体と抗 NA 抗体、さらにはコントロールとして NIBRG-14 と内部タンパクを共有する PR8 不活化全粒子に結合する抗体濃度を測

定した。図2に示すように、HA結合カラムやNA結合カラムを通した血清では、抗HA抗体や抗NA抗体濃度がそれぞれ非除去血清に比べて3.5%以下に低下した。一方で、PR8不活化全粒子に含まれるHAとNA以外の内部タンパクに対する抗体濃度に顕著な変化は認められなかった（抗HA抗体除去血清; 91.5%、抗NA抗体除去血清; 81.5%）。このことから、抗HA抗体や抗NA抗体が選択的に除去されたものと判断した。

(3) 血清移入実験を用いた抗HA/NA抗体除去血清の感染防御能の比較

各血清の感染防御能を比較するため、昨年度同様、先天性免疫不全scidマウスへの移入実験を行った。予備実験の結果、本年度の実験条件では、抗血清に含まれる中和抗体の濃度が25%以下になると、感染防御能が有意に低下する。そのため、カラム透過後に残存する3.5%以下の抗HA抗体や抗NA抗体の影響は、今回無視できると判断した。実際に各血清をscidマウスに移入後、強毒H5N1株に対する生存曲線の変化を観察した結果、非除去血清を移入したマウスでは、感染後21日後でも90%ものマウスが生存するのに対し、抗HA抗体を除去した血清を移入した群では、生存率が12.5%にまで低下した（図3）。このことから、NIBRG-14ワクチンが誘導する抗HA抗体は、HI活性や細胞変性を阻止する中和活性が低いにも関わらず、生体内での感染防御に寄与していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、抗NA抗体を除去した血清を移入した群でも、マウス生存率が抗HA抗体除去群と同様に低下し、抗HA+NA抗体を除去した血清では生存率のさらなる低下が観察された。以上の結果から、NIBRG-14ワクチンが賦与する感染防御反応には、抗HA抗体と抗NA抗体の両者が必要となる可能性が示唆された。

D. 考察

現在国家備蓄されているNIBRG-14ワクチンのシードウイルスは、ベトナムで単離された高病原性鳥インフルエンザウイルスのHA（改変型）とNAを使用する。そのため、他の鳥インフルエンザウイルスでの報告例と同様に、マウスやフェレット等の哺乳動物に接種した場合、血清HI抗体価の顕著な増加は認められない。さらに、マウス接種後に産生される抗HA抗体は、細胞株の細胞変性阻害を指標とした中和活性も低いため、NIBRG-14ワクチンが賦活する感染防御機構の詳細は不明であった。本年度の研究で、抗HA抗体と抗NA抗体の感染防御能を比較した結果、意外なことに抗HA抗体と抗NA抗体の感染防御能が同等である可能性が示唆された。古くから、抗NA抗体に感染防御効果があることは、いくつかの実験系で証明されているものの、わずかに抗HA抗体の7分の1の濃度しか含まれない抗NA抗体が感染防御に必要であり、かつ抗NA抗体の除去により失われた感染防御能が抗HA抗体でカバーできなかったことは、大変興味深い現象である。このことは、抗NA抗体の感染防御メカニズムが、抗HA抗体と質的に大きく異なる可能性を強く示唆するものであり、今後抗HA抗体と抗NA抗体によって賦与される感染防御機構を様々な免疫パラメーターを指標として詳細に解析する必要がある。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活性を有する抗HA抗体価と感染防御能が関連するため、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感染防御反

応は、抗 HA 抗体のみならず抗 NA 抗体にも依存するため、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

NIBRG-14 ワクチンが惹起する感染防御効果は、抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の両者に依存すると結論づけた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi, Y. Memory B cells in systemic and mucosal immune response; Implications for successful vaccination. *Biosci. Biotech. Biochem.* 71:2358-2366, 2007

2. 学会発表

[国際学会発表]

(第13回国際粘膜免疫学会、東京、2007年7月)

- (1) Umeda, Y., Kuraoka, M., Yamada, K., Houro, T., Takahashi, Y., Tsuji, N.M., Totsuka, M., Takatsu, K., Kaminogawa, S., Sato, R., Hachimura, S. 「CD3-IL-2R+ Peyer's patch cells respond to TLR stimuli, secrete IL-5, and induce IgA production.」

[国内学会発表]

(第37回日本免疫学会、東京、2007年11月)

- (1) 高橋宜聖、阿戸学、小林和夫 「H5N1インフルエンザワクチンが惹起する防御抗体はウイルス中和に補体因子を必要とする」
- (2) Umeda, Y., Akema, Y., Kuraoka, M., Takahashi, Y., Yamada, K., Tsuji, N.M., Kouro, T., Totsuka, M., Takatsu, K., Kaminogawa, S., Sato, R., Hachimura, S. 「Intestinal CD3-IL-2R+ cells respond to poly I:C stimuli and influenza virus infection.」
- (3) 加地友弘、高橋宜聖、竹森利忠 「IgG1メモリーB細胞産生における転写因子制御機序の解析」

(第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月)

- (4) 高橋宜聖、阿戸学、北原玄太、二宮愛、小田切孝人、田代真人、小林和夫 「H5N1型プレパンデミックワクチンによる感染防御メカニズムの解析」

- ## H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
- なし

図1 NIBRG-14 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体価と抗 NA 抗体価の比較

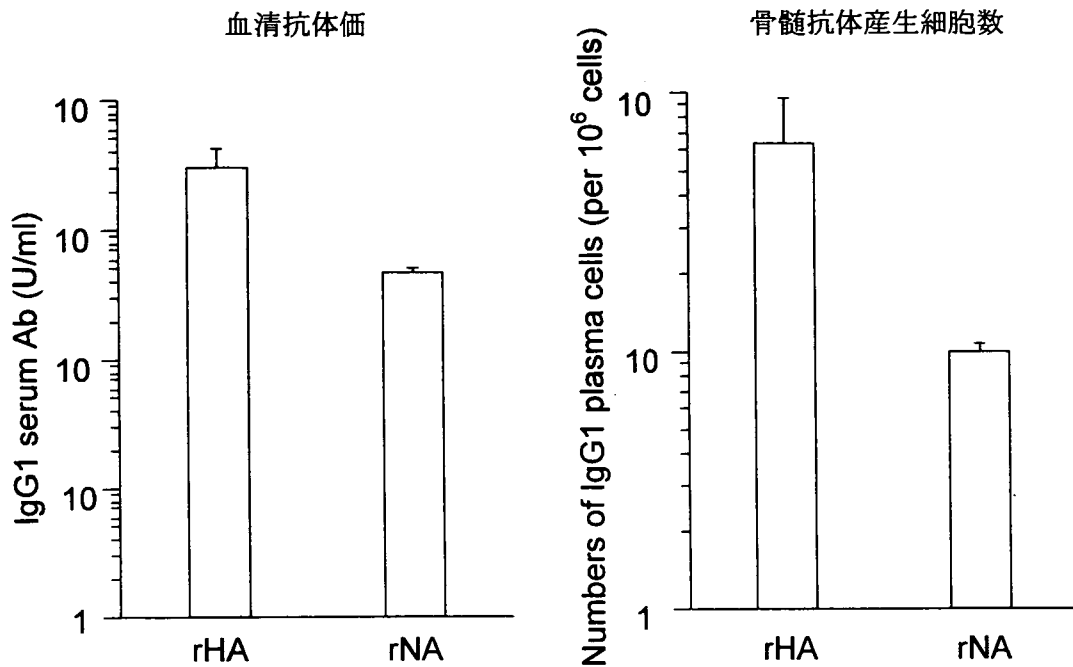


図2 抗 HA 抗体と抗 NA 抗体の除去効率の測定

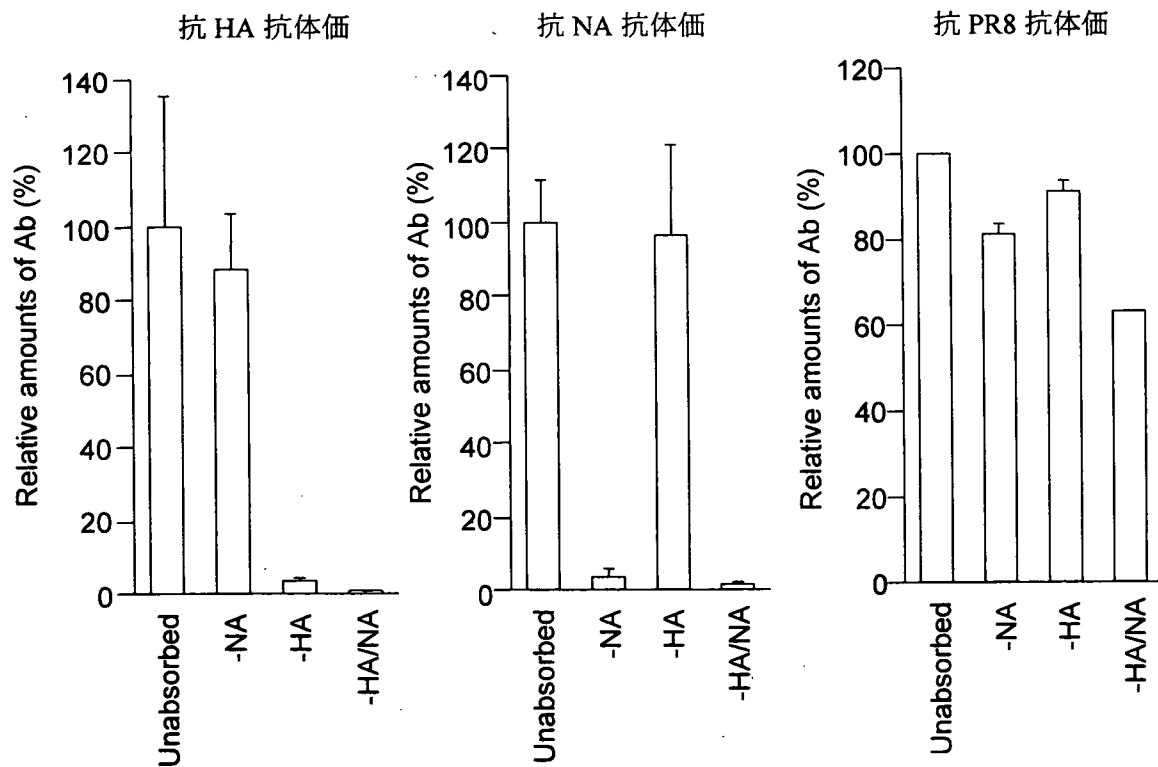
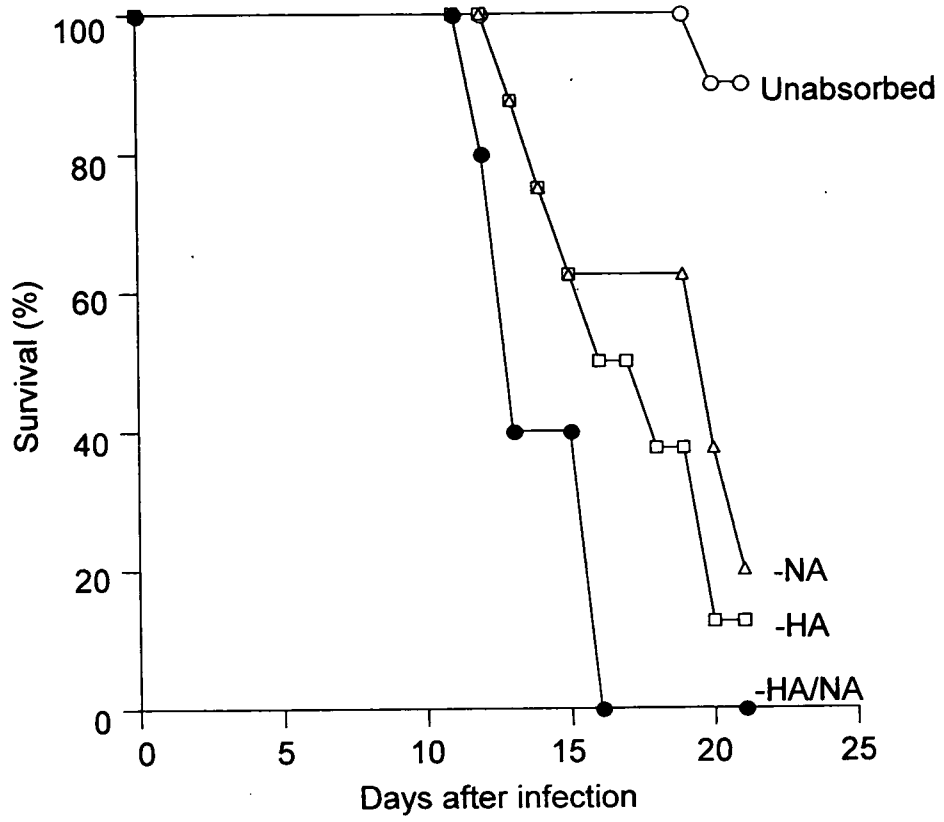
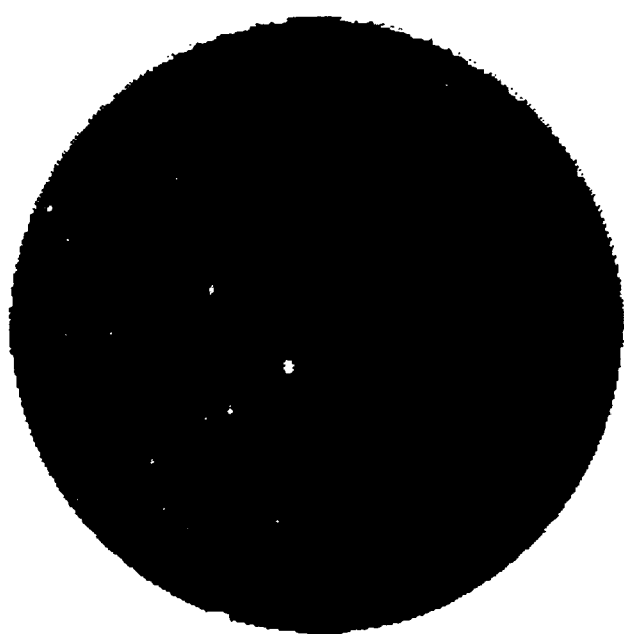


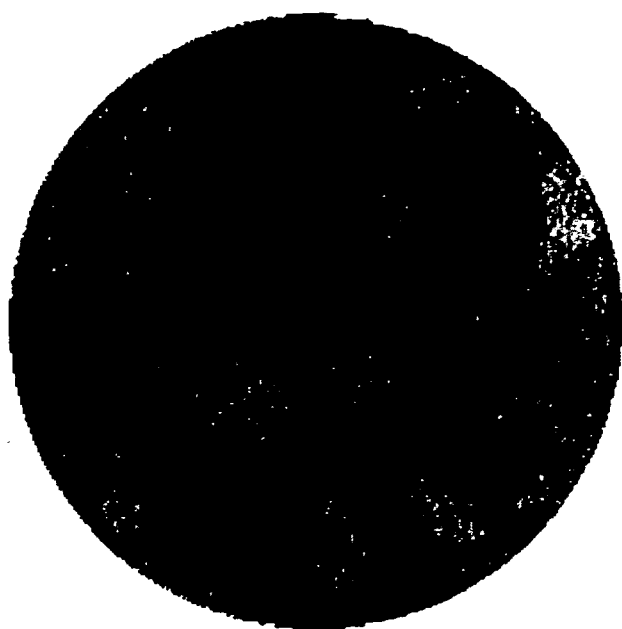
図3 抗HA/NA抗体除去による感染防御能の変化



デングウイルスプラーク形成の比較



Vero9013



Vero-SFM

デングウイルス2型感染により形成されたプラークは、Vero-SFMの方が大きなプラークを形成した(接種後7日目)。

図2. デングウイルス増殖力の比較

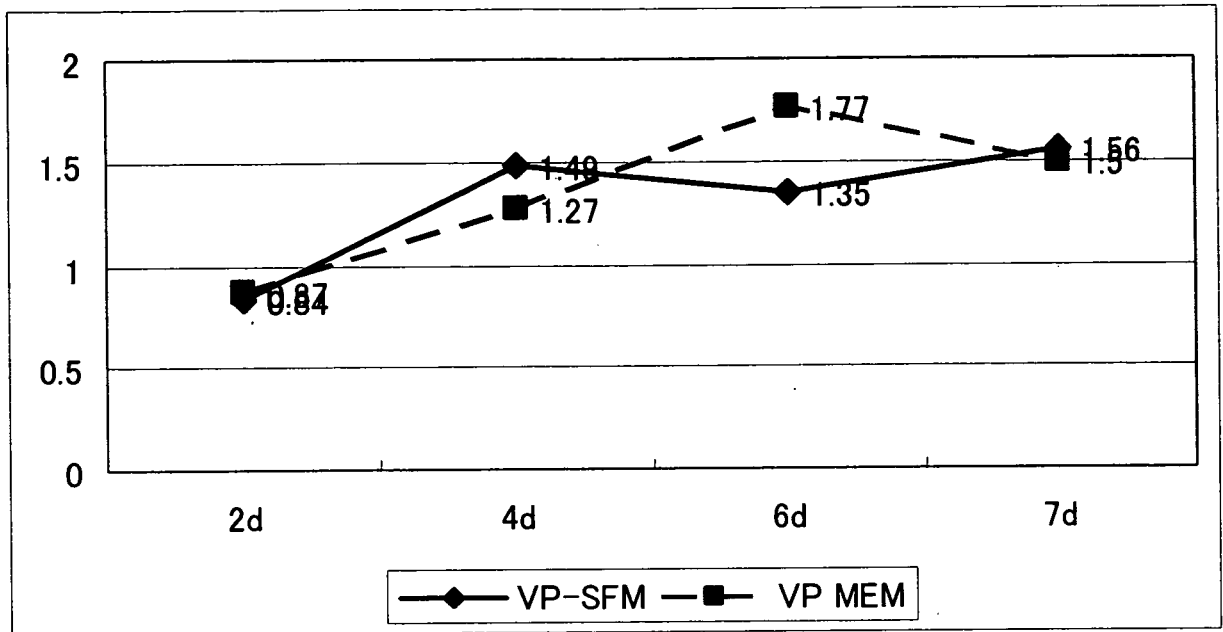
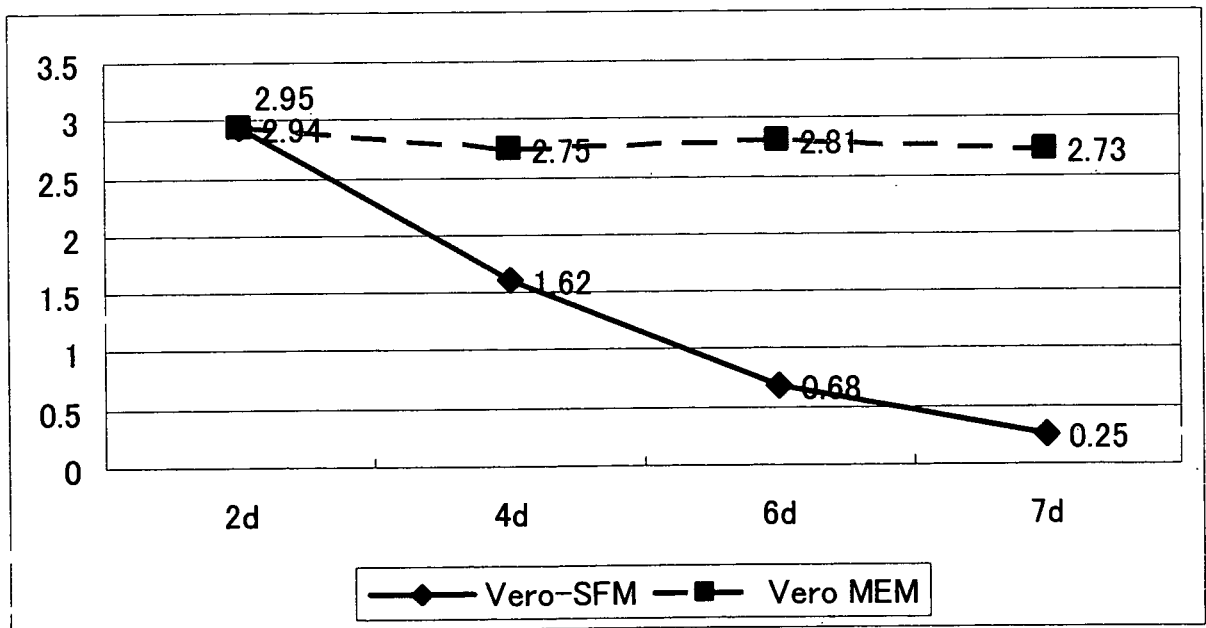


図3. 日本脳炎ウイルス増殖力の比較



鳥類由来インフルエンザ A ウイルスのネコにおける感染機構の解析

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

山本美江 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

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、H5N1 亜型の弱毒及び強毒株ウイルスのネコ由来培養細胞及び MDCK 細胞やその他の動物由来培養細胞での増殖性を調べた。いずれのウイルス株もネコ由来培養細胞 CRFK, Fc3Tg, FCWF-4, AK-D やミンク由来細胞で MDCK 細胞と同等またはそれ以上に増殖したがウサギやマウス由来細胞では増殖が低かった。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、各細胞の受容体やウイルス複製における因子等の更なる解析が必要である。

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) 発生と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いる。また、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も報告され、ネコへの実験的感染が成立することも明らかになっている。

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おり、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 $\alpha 2-6$ 型分子を認識しやすいとされている。また、ウイルスのポリメラーゼ蛋白等の違いが哺乳類でのウイルス増殖性や病原性に関与していることが報告されている。

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由来培養細胞ならびに各種動物由来細胞での強毒型及び弱毒型 H5N1 亜型の鳥類由来インフルエンザ A ウイルスの増殖性を調べた。

B. 研究方法

ネコ由来細胞株として、CRFK、AK-D、Fc3-Tg、fcwf-4 細胞を用いた。また、ミンク由来の Mv1-lu、マウス由来細胞株として MLg と LA-4、ウサギ由来 R9ab、RK13、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。

使用したウイルスは、弱毒型で野生カモ糞便より分離された A/Duck/Hyogo/31/01 (H5N1) (神戸市環境保健研究所より分与) 及び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 /04 (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 または 0.01 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。弱毒型ウイルスでは細胞に障害を与えない最高濃度の TPCK 処理トリプシンを添加して培養した。

C. 研究結果

弱毒型ウイルスを 11 種類の培養細胞に感染させ 24 時間、48 時間、72 時間におけるウイルス量を測定した (図 1)。ネコ由来細胞の CRFK, Fc3Tg, fcwf-4 および AK-D 細胞では 24 時間目で、MDCK 細胞での $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml よりはやや低い $10^{3.85} \sim 4.56$ TCID₅₀/0.1ml (MOI:0.01) を示した。また、ミンク細胞である Mv1-lu では $10^{5.2}$ TCID₅₀/0.1ml と最も高かった。一方ウサギやマウス由来細胞では増殖が低かった。

強毒型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。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 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 (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ネコやトラなどの致死感染やネコでの実験的感染が成立することが報告されている。しかしその感染機構、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。

本研究では、強毒型及び弱毒型のインフルエンザウイルスのネコ由来 CRFK, fcwf-4, AK-D, Fc3Tg の 4 種類の培養細胞とその他の動物由来細胞における増殖性を調べた。強毒弱毒型にかかわらず鳥類由来 H5N1 亜型インフルエンザウイルスは増殖できることが分かった。また、ミンク由来 Mv1-lu 細胞において

も同様にウイルスは増殖した。一方、ウサギやマウス由来細胞でのウイルス増殖はよくなかった。これらの結果は、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り、ネコなどが感染鶏の喫食で感染しうることを示している。しかしながら、感受性細胞へのウイルスの吸着侵入、複製、出芽のどの段階で細胞種に差があるのか詳細な解析が必要である。

また、ネコ等の細胞でウイルスが増殖変異し、または選択され哺乳類への感染効率が上昇する可能性について調べるためにネコ細胞でのウイルスの継代を試みたが 10 回の盲継代では十分なウイルス増殖がなく解析には至らなかった。継代方法を検討し性状解析をする必要がある。

E. 結論

弱毒及び強毒型の鳥類由来インフルエンザ A ウイルスがネコ由来培養細胞でともによく増殖するがウサギやマウス細胞では低いことが分かったが、ウイルス増殖に関わる受容体や複製出芽に関する細胞の性状を詳細に解析する必要があると考えられた。

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

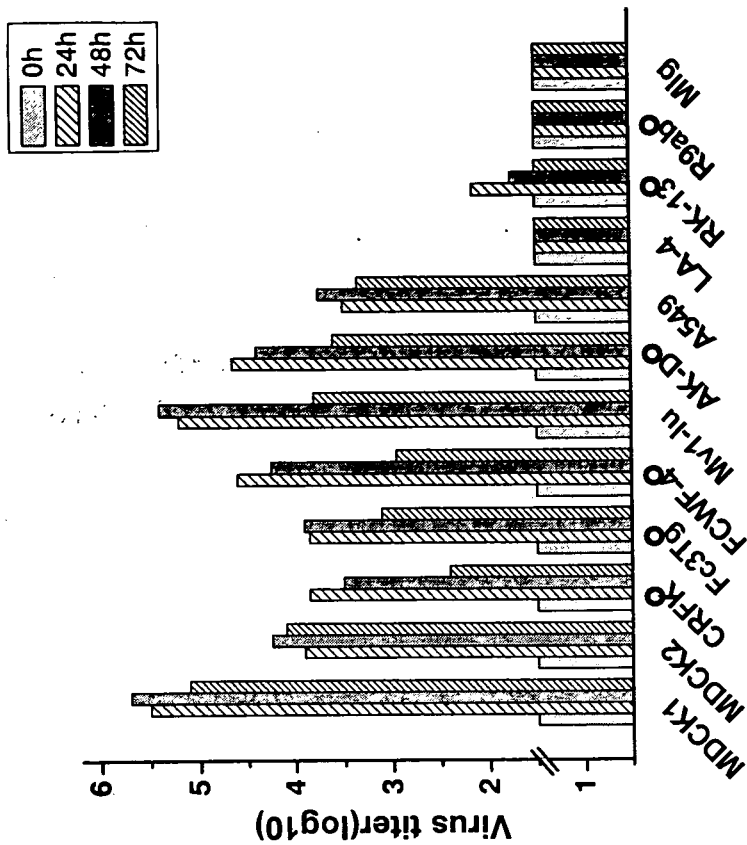
1. 特許取得

なし

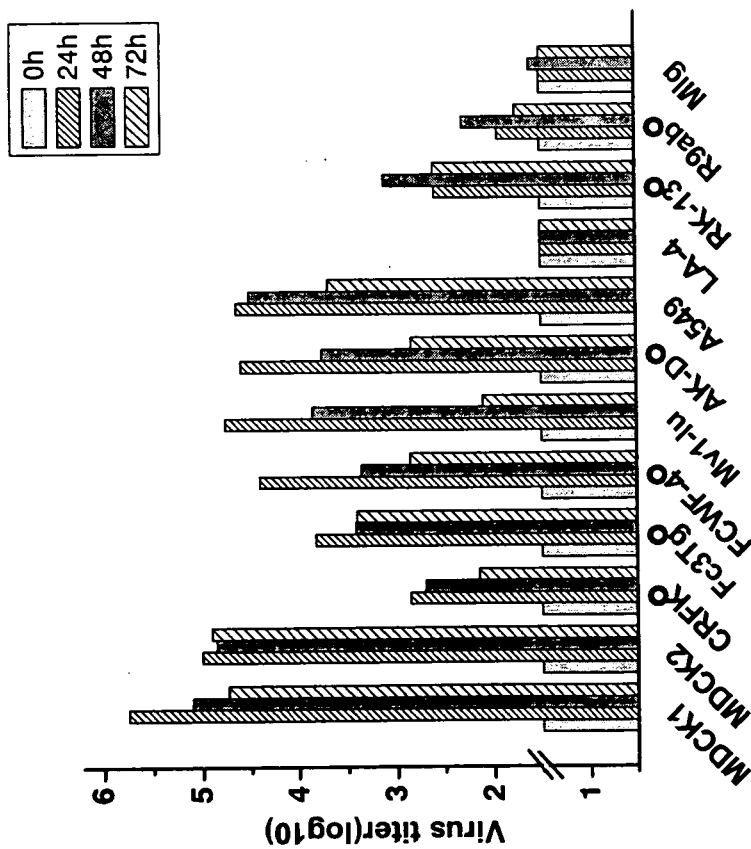
2. 実用新案登録

なし

Moi 0.01

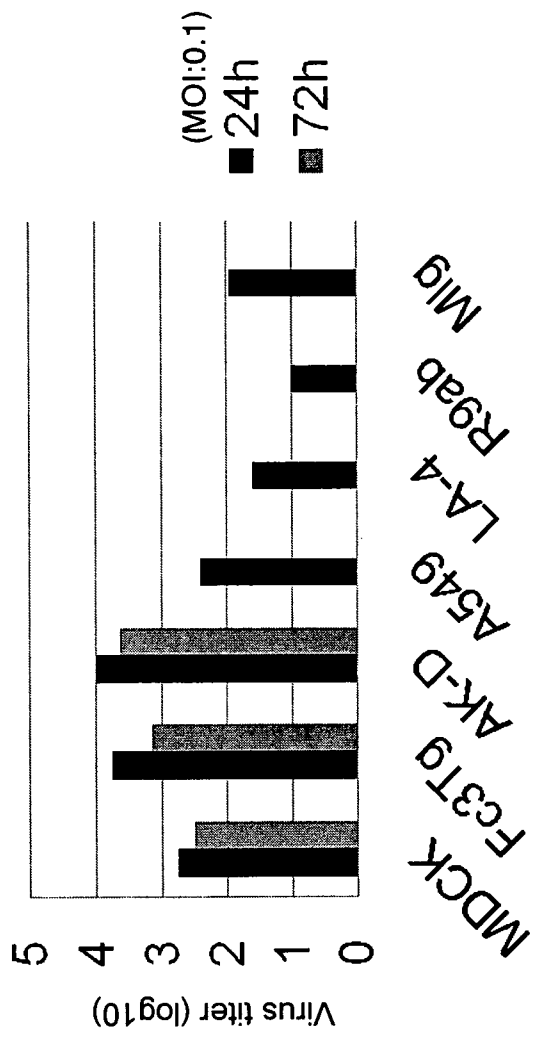


Moi 0.1



	MDCK1	MDCK2	RK-13	FCWF-4	R9ab	CRFK	FC3Tg	Mig	Mv1-lu	LA-4	AK-D	A549
	イヌ腎臓	イヌ腎臓	ウサギ肺	ネコ	ウサギ肺	ネコ	ネコ舌	mouse	ミンク肺	mouse	ネコ肺	ヒト肺がん
Trypsin	0.7µg/ml	0.03µg/ml	0.7µg/ml	0.3µg/ml	0.1µg/ml	0.06µg/ml	0.03µg/ml	0.03µg/ml	0.03µg/ml	0.03µg/ml	0.06µg/ml	0.1µg/ml

図1. 各種培養細胞での弱毒型鳥類由来インフルエンザウイルスの増殖



各細胞2穴における感染価をMDCK細胞で測定し、その平均値を $10^{\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}}$ として表した。ウイルスはA/bwfly/Kyoto/93/2004(H5N1)でトリプシンは添加せずに実施した。

図2. 各種培養細胞での強毒型鳥類由来インフルエンザウイルスの増殖

分担研究報告-1

H5N1 亜型インフルエンザウイルスを保有するオオクロバエを摂食したニワトリに対する
経口感染の可能性について

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)
協力研究者 澤邊 京子 (同・昆虫医科学部 室長)
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 主任研究官)
佐々木年則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)
伊藤 啓史 (鳥取大学農学部 獣医公衆衛生学教室)
伊藤 壽啓 (鳥取大学農学部 獣医公衆衛生学教室)
二瓶直子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部 客員研究員)
斉藤康秀 (麻布大学獣医学部)
棚林 清 (国立感染症研究所・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: ウイルス保有オオクロバエの摂食によるニワトリ経口感染の可能性を検討するために、まず H5N1 亜型ウイルス強毒株を用いてウイルス保有クロバエを作成し、ハエ体内でのウイルスの生存を弱毒株での結果と比較した。その結果、強毒株のウイルス力価はオオクロバエが摂食した後 48 時間まで維持されることが判明した ($10^{1.8-2.8}$ EID₅₀/0.1ml)。前回の弱毒株に対する摂食実験では、その判定に MDCK 細胞への接種法を用いたが、今回の強毒株摂食実験では、発育鶏卵接種系により行った。一般に、鶏卵接種法が MDCK 接種法に比べ 10 倍検出感度が高いといわれていることから、結果に 24 時間の差異が生じたと考えられる。したがって、本結果により、クロバエ体内でウイルスが生存する時間は 24~48 時間であると結論したい。また、オオクロバエ 31 頭を約 6 週齢のニワトリが入ったケージに放したところ、7 分ですべてのハエが捕食されたことから、ニワトリは目前に止まったハエ類を好んで食べることが確認された。なお、ニワトリへのウイルス保有クロバエの摂食実験は現在調整中である。

A. 研究目的

わが国において 2003 年 12 月山口県阿東町の養鶏場に始まった高病原性鳥インフルエンザの流行は、翌年 1 月大分県九重町に波及し、次いで、京都府丹波町の養鶏場で甚大な被害を及ぼした (Mase et al., 2005)。2005 年および 2006 年には茨城・埼玉両県下で弱毒タイプの H5N2 亜型ウイルスが流行したが、2007 年 1 月には宮崎県と岡山県において H5N1 亜型ウイルスが再燃したことは記憶に新しい。一方、アジア諸国においては、

H5N1 亜型ウイルスは水禽および家禽類の間でしばしば流行を引き起こし、家禽類の経済的損失は甚大である。しかし、近年の深刻な問題は、本ウイルスが人にも直接感染し、致命的な症状を引き起こした症例が増加していることである (2008 年 3 月 5 日現在, WHO に公式に報告された確定感染者数 371 名中 235 名が死亡)。

これまでの日本国内の流行に際し、発生農場へのウイルスの侵入ルートは解明されていない。その

ような中であって、京都府丹波町で採集した2種類のオオクロバエから H5N1 亜型インフルエンザウイルス遺伝子が検出され、その 10%からウイルスが分離された(Sawabe et al., 2006)ことは、冬季のトリインフルエンザ流行時に、冬季に活動する昆虫がウイルス伝播に関与する可能性を強く示唆するものとなった。さらに、H5N1 亜型(弱毒株)ウイルス液を実験的に摂食させたオオクロバエの体内では、摂食後 24 時間までは感染性のあるウイルスが維持されることが確認された。

そこで本年は、ニワトリが本ウイルス保有クロバエを摂食することによって、ニワトリへの経口感染が成立するかを検討するために、まず、H5N1 亜型強毒株ウイルス液を前回同様にオオクロバエに摂食させ、ウイルス保有クロバエを作成した。次いで、実際にニワトリが生きたクロバエをどのように食するかの疑問を解決するために、ビデオテープ撮影によって詳細に観察した。

B. 研究方法

1. オオクロバエへのウイルス摂食実験

1) H5N1 亜型ウイルス液の調整

弱毒株ウイルス(A/duck/Hyogo/35/01, 神戸市環境保健研究所より分与)は、発育鶏卵で増殖させ、しょう尿膜腔より回収した。段階希釈し発育鶏卵接種系により定量し、初期量(原液)を 10^8 EID₅₀/ml に調整した。

強毒株ウイルス(A/Crow /Kyoto/T-1/04)は、2004 年京都府での高病原性鳥インフルエンザ流行時に、本ウイルス感染によって死亡したカラスより分離されたウイルス株で、その後鳥取大学で増殖、保存されたウイルスである。弱毒株同様に発育鶏卵で増殖させ、しょう尿膜腔より回収した。ウイルス液の初期量(原液)は 4×10^7 EID₅₀/ ml である。

2) オオクロバエ *Calliphora nigribarbis*

室温 20°C、70-75%RH 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* を 20cm 立方金網ケージ内で羽化させ、雌雄混在のまま約 3%の砂糖水を与えて飼育した。羽化後 10 日目に CO₂ 麻酔下でメス成虫を選別し、

実験に供した。弱毒株の摂食には京都系統オオクロバエを使用し、強毒株の摂食には出水系統を用いた。

3) クロバエへのウイルス摂食実験

弱毒株の摂食実験(感染研昆虫医科学部 4 階 P2 動物飼育室にて実施)の詳細は、17 年度本研究報告書に記述したとおりである。強毒株の摂食実験(鳥取大学農学部獣医学科 4 階 P3 感染実験室にて実施)は、前述した弱毒株摂食方法と同様に、オオクロバエに約 3 時間摂食させ、摂食後 3, 6, 24, 48 時間後に解剖し、消化管(そ嚢および腸管)を摘出し、ウイルス乳剤を作成した。

4) ウイルス分離

強毒株を摂食させた実験で、各摂食時間後のオオクロバエをそれぞれ 2 頭ずつ解剖し、2 頭分のそ嚢および腸管を MEM 培養液(200U/ml ペニシリン、200µg/ml ストレプトマイシン、50µg/ml ゲンタマイシン、0.5µg/ml ファンギゾン、血清の添加はない)400µl 中で、ペストルを用いて慎重に磨砕した。マイクロ遠心機で軽く遠心し、上清を回収し、沈渣には再度 400µl の MEM 培養液を添加し、同様の手順で上清を回収。最終量 800µl のウイルス乳剤を作成した。ウイルス分離用乳剤は 3 倍希釈し、各 0.1ml ずつ 10 日齢の発育鶏卵に接種した。37°C、2 日間培養した後、しょう尿膜腔液を回収し、HA テストを Reed and Munch の方法に従いウイルス力価を算出した。

弱毒株を摂食したオオクロバエから作成したウイルス乳剤からは、発育鶏卵接種によりウイルス分離、MDCK 細胞接種によりウイルス力価の測定、および RT-PCR 法によるウイルスゲノムの検出を行った。詳細は 17 年度本研究報告書に記載されたとおりである。

2. ハエを摂食するニワトリの観察

透明のアクリル製ケージ(縦 1m×横 50cm×高さ 50cm)に約 6 週齢のニワトリを入れ、あらかじめ 20°Cの温度に慣らしておき、そのケージ内にオオクロバエ 31 頭を放した。生きたハエを摂食する様子は、ビデオ撮影によって詳細に記録し

た。

C. 結果

1. 弱毒株摂食実験

表 1(17 年度本研究報告書より改変)に示すように、3 時間のウイルス液摂食直後のオオクロバエ 10 頭中 2 頭のウイルス力価は検出限界以下であったが、10 頭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された。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。クロバエの冬季低温下での生存条件を考慮した実験区(10°C)に 14 日間維持した後のクロバエからは、そ嚢・腸管のいずれからもウイルスは分離されなかった。

MDCK 培養細胞接種により測定されたウイルス力価は、摂食直後はそ嚢で $1.67-4.63 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.05\text{ml}$ (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。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°C で保管されたウイルスの滲み込んだ脱脂綿は 48 時間後までウイルス力価 ($4.5-5.6 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.05\text{ml}$) は高く維持されていた。

一方、RT-PCR による遺伝子の検出は、そ嚢・腸管のみならず、クロバエ体表の洗浄液と吐出物、排泄物、摂食に用いた脱脂綿も含むすべてのウイルス乳剤から、HA (ヘマグルチニン)あるいは M (マトリックスタンパク) 遺伝子断片が検出された。

2. 強毒株摂食実験

オオクロバエはウイルス液摂食後 48 時間までの

ウイルス力価は、実験開始直後の $4.0-4.5 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ から徐々に低下したものの、摂食 48 時間後でも $1.8-2.8 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ の力価を示し、ウイルスも分離された。弱毒株の摂食実験よりも 24 時間長くハエ体内で維持された結果が示唆された。

3. ハエを摂食するニワトリの観察

オオクロバエ 31 頭を約 6 週齢のニワトリが入ったケージに放し、ハエを摂食する様子を観察した。15 分の観察中、開始後 7 分ですべてのハエが捕食された(図 1)。このことから、ニワトリは目前に止まったハエ類を好んで食べることが確認された。

D. 考察

オオクロバエの国内での移動・分散を調査した mark-release-recapture 実験から、このハエは 1 日に少なくとも 2~3 km の飛翔は容易であることが示唆された(Tsuda et al., 未発表)。鳥インフルエンザが流行した丹波町の 2 軒の養鶏場はわずかに 4 km しか離れておらず、実際に両鶏舎のほぼ中間地点である 2 km を過ぎた場所(地点 C)でもウイルス遺伝子陽性のオオクロバエが採集されている。本研究で、ウイルス力価はクロバエ体内で 48 時間は維持されることが明らかとなり、この結果によって 2~3 km の比較的近隣に存在する鶏舎間では、クロバエ類によるウイルスの伝播は十分に可能があると言えよう。

一方、鳥インフルエンザウイルスの海外からの侵入に関する具体的な経路や方法などは、依然として明らかにされていない。ウイルスに感染したカモ類などの渡り鳥が海外より飛来し、これらの渡り鳥が感染源となって養鶏場にウイルスを持ち込んだ可能性が高いと考えられているが、では、その渡り鳥の飛来地から鳥インフルエンザ発生農場へは、ウイルスはどのようにして運ばれたのだろうか? カモ以外の野鳥が養鶏場にウイルスを持ち込んだという説もあるが、発生農場の多くは防鳥ネットを使用しており、野鳥と鶏が接触した可能性は極めて低い。前号でも紹介したように、クロバエ類の移動

能力は非常に優れることが知られており、晩秋に大陸から長距離飛翔してくる集団の存在が示唆されるほどである(Kurahashi, 1991)。約 200 km の対馬海峡を渡ることも 48 時間であれば可能かもしれない。

オオクロバエの国内での繁殖期に当たる秋から春にかけて行った、渡り鳥の飛来地周辺におけるハエ類を対象とした調査で、2006 年 11 月下旬に佐賀県で採集されたオオクロバエから、水禽類由来の H5 亜型以外の A 型インフルエンザウイルスが検出されたこと(18 年度本研究報告書)は興味深い。カモ類が種々な亜型のインフルエンザウイルスに感染することは知られているが、オオクロバエがそのようなウイルス遺伝子を持っていたという事実は、オオクロバエが水禽類と接触し、その排泄物からウイルスを摂取したであろうことを示唆している。養鶏場に飛来したオオクロバエが、防鳥ネットをかいくぐって鶏舎内部に侵入することは容易であろう。

農家においては、経験的にニワトリはハエ類を好んで食べると信じられているが、オオクロバエが容易に鶏舎に侵入することが出来たとしても、ニワトリが食べなければ感染は成立しない。ニワトリの食餌の嗜好性は重要な問題である。しかし、本研究で、オオクロバエが近くを飛び回るハエを容易に捕まえ、生きてままでも食べる習性があることが明らかになった。そのハエが、ウイルスを保有していれば、ニワトリがクロバエを介してウイルスに感染する可能性は高いと思われる。今後、ニワトリへのウイルス保有ハエの摂食実験の結果から結論したい。

E. 結論

1) H5N1 亜型インフルエンザ A ウイルス弱毒株 (A/duck/Hyogo/35/01) を摂食したオオクロバエの摂食後 14 日目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。

2) MDCK 細胞培養系によるウイルス力価測定結

果からも、摂食直後はそ嚢で $1.67-4.63 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.05\text{ml}$ (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、時間を追うごとに減少したが、一部、48 時間後の排泄物および吐出物からウイルスが分離された。

3) H5N1 亜型ウイルス強毒株 (A/Crow/Kyoto/T-1/04) を摂食した場合、摂食後 48 時間までそのウイルス力価が維持され ($10^{1.8-2.8} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$)、クロバエ体内での生存可能な時間は 48 時間であることが推察された。

4) オオクロバエ 31 頭を約 6 週齢のニワトリが入ったケージに放したところ、7 分ですべてのハエが捕食された。ニワトリは目前に止まったハエ類を好んで食べることが確認された。

F. 健康危険情報

G. 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 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.* 75: 327-332.

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(2005) 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.

3) 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. 2月. 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. 4月. 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. 6月. 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シンポジウム. 6月. 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シンポジウム. 6月. 札幌市.

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 1 H5N1 亜型ウイルス(弱毒株)を摂食したオオクロバエ体内でのウイルスの生存

Post-exposure	n	Crop			Gut			Feces and vomit matters		
		VI	TCID	PCR	VI	TCID	PCR	VI	TCID	PCR
3h	1	+	3.50	+	+	3.50	+			
	2	+	3.33	+	+	4.00	+			
	3	+	1.83	+	+	0.50	+			
	4	+	4.60	+	+	3.50	+			
	5	+	2.60	+	+	3.00	+			
	6	+	1.67	+	+	1.67	+			
	7	+	<0.50	+	+	<0.50	+			
	8	+	4.63	+	+	3.50	+			
	9	+	3.00	+	+	3.63	+			
	10	+	<0.50	+	+	<0.50	+			
6h	1	+	<0.50	+	+	3.50	+	-	NT	+
	2	+	<0.50	+	+	1.50	+	-	NT	+
	3	-	<0.50	+	-	<0.50	+	-	NT	+
9h	1	+	1.00	+	+	1.00	+	-	NT	+
	2	+	<0.50	+	+	<0.50	+	-	NT	+
	3	-	<0.50	+	-	<0.50	+	-	NT	+
24h	1	-	<0.50	+	-	<0.50	+	-	NT	+
	2	-	<0.50	+	-	<0.50	+	-	NT	+
	3	+	1.67	+	+	<0.50	+	-	NT	+
48h	1	-	NT	+	-	NT	+	+	<0.50	+
	2	-	NT	+	-	NT	+	-	NT	+
	3	-	NT	+	-	NT	+	-	NT	+

VI: virus isolation by embryonated chicken eggs
 TCID: virus titers (\log_{10} TCID₅₀/0.05 ml) were calculated by the inoculation onto MDCK cells
 PCR: RT-PCR performed with specific primers for the HA and M genes
 NT: not tested

(17年度本研究報告書より改変)

表 2 H5N1 亜型ウイルス(強毒株)を摂食したオオクロバエ体内でのウイルスの生存

Post-exposure	n	Crop & Gut	
		VI	EID
3h	1	+	4.0
	2	+	4.5
6h	1	+	4.5
	2	+	3.3
24h	1	+	3.8
	2	+	3.3
48h	1	+	2.8
	2	+	1.8

VI: virus isolation by embryonated chicken eggs
 EID: virus titers (\log_{10} EID₅₀/0.1 ml) were calculated by the inoculation into embryonated chicken eggs.