

図1 NIBRG-14 ワクチンの IFN- α 産生誘導能

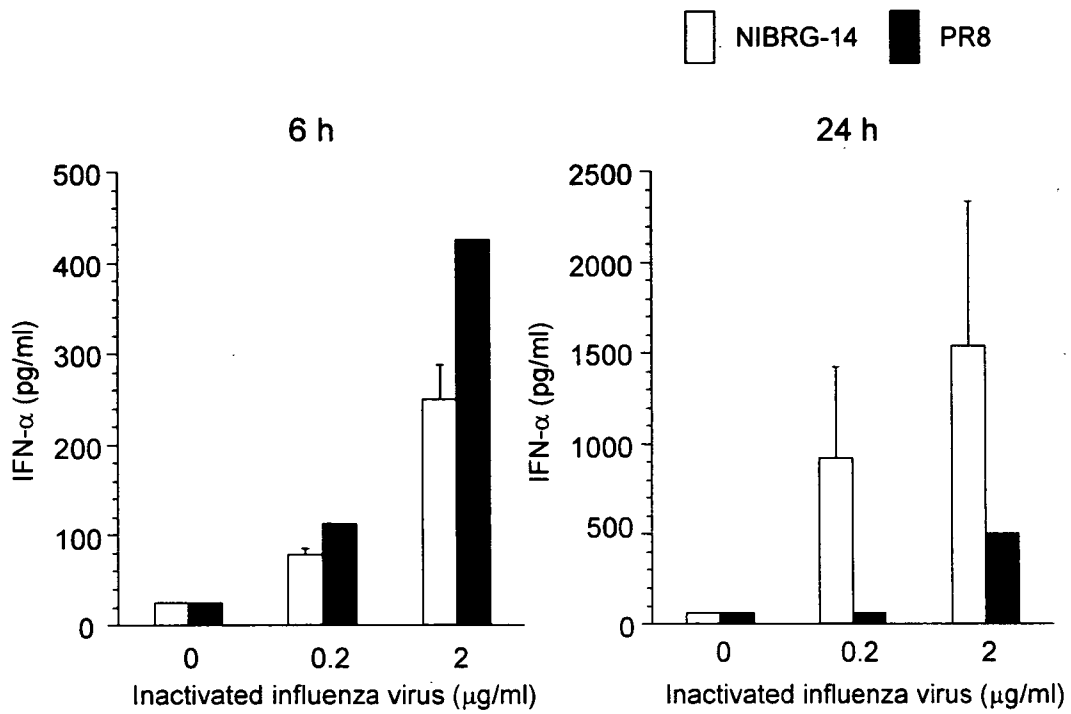


図2 NIBRG-14 ワクチン抗血清に含まれる HI 抗体価と中和抗体価の測定

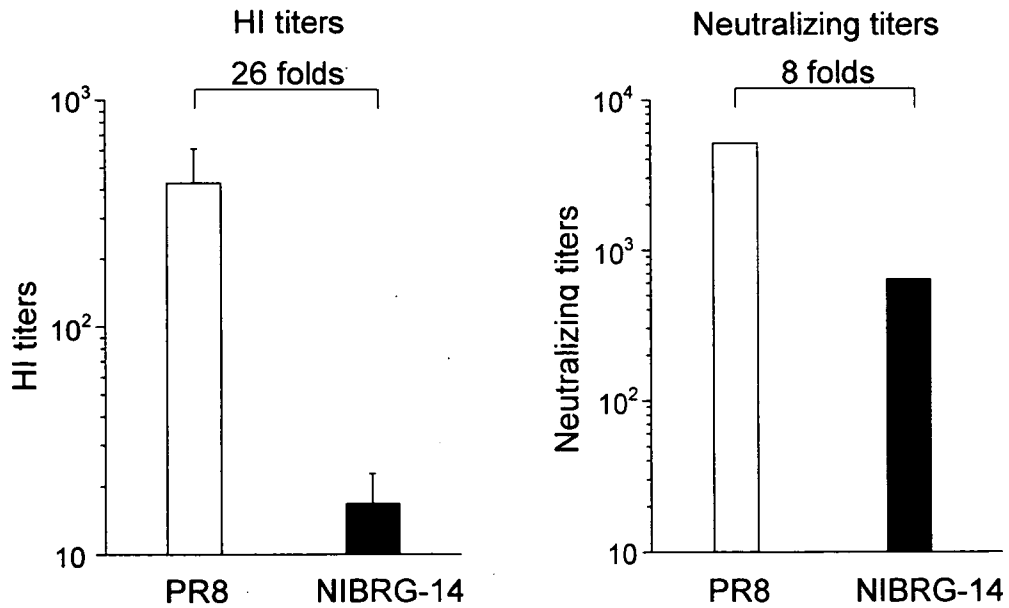


図3 NIBRG-14 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体価と抗 NA 抗体価の測定

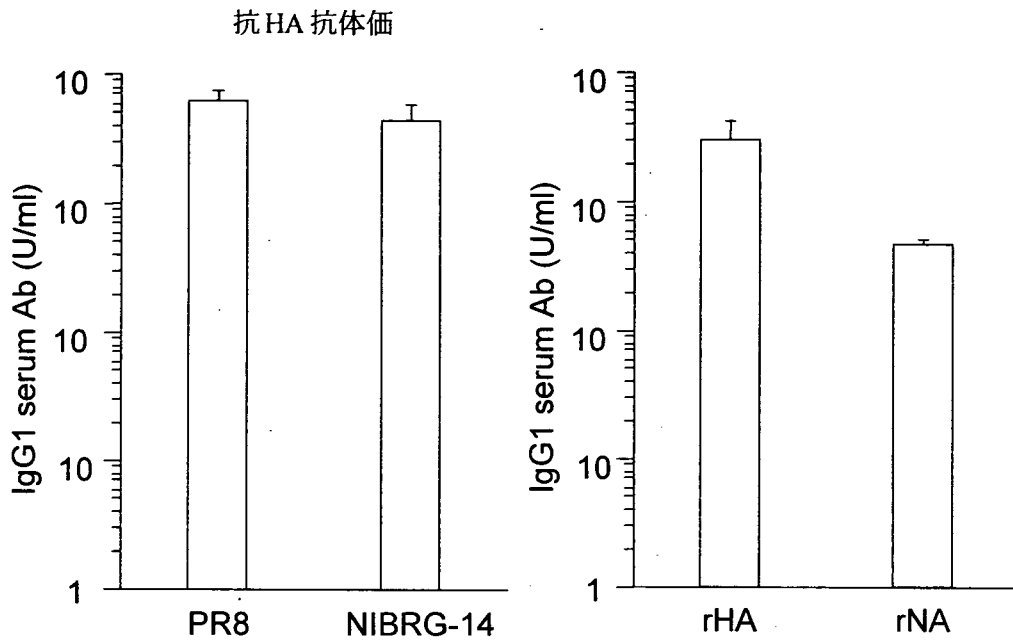


図4 NIBRG-14 ワクチンによる感染防御に必要な獲得免疫因子の同定

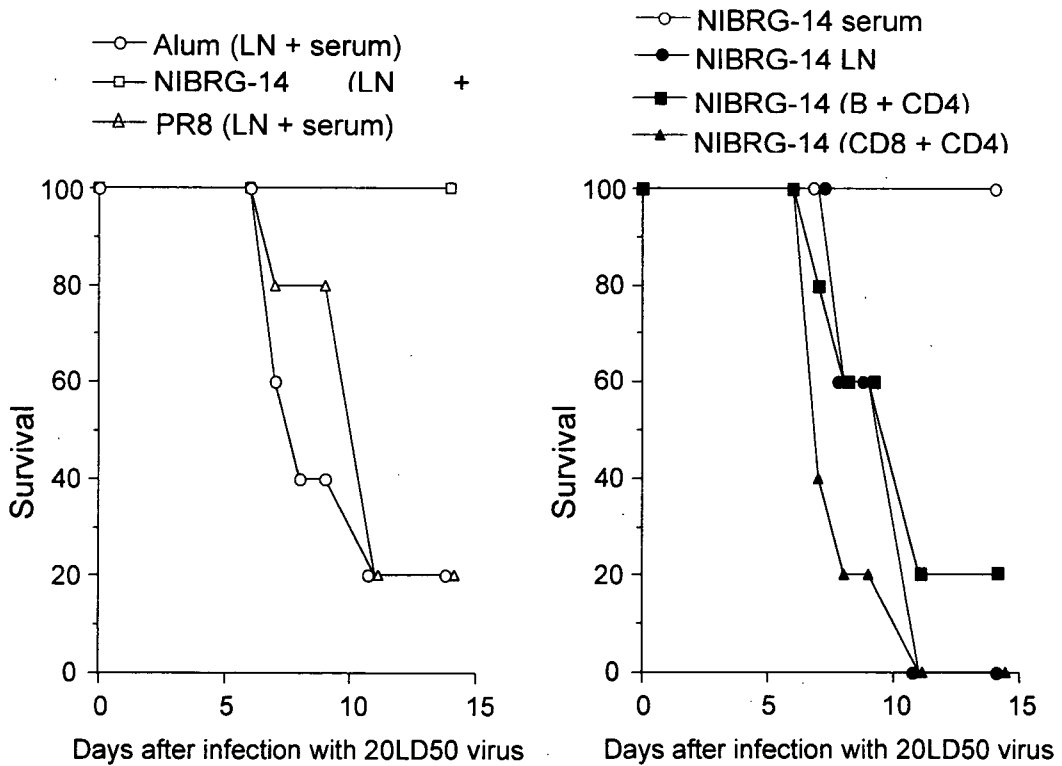


図5 抗HA抗体と抗NA抗体の除去効率の測定

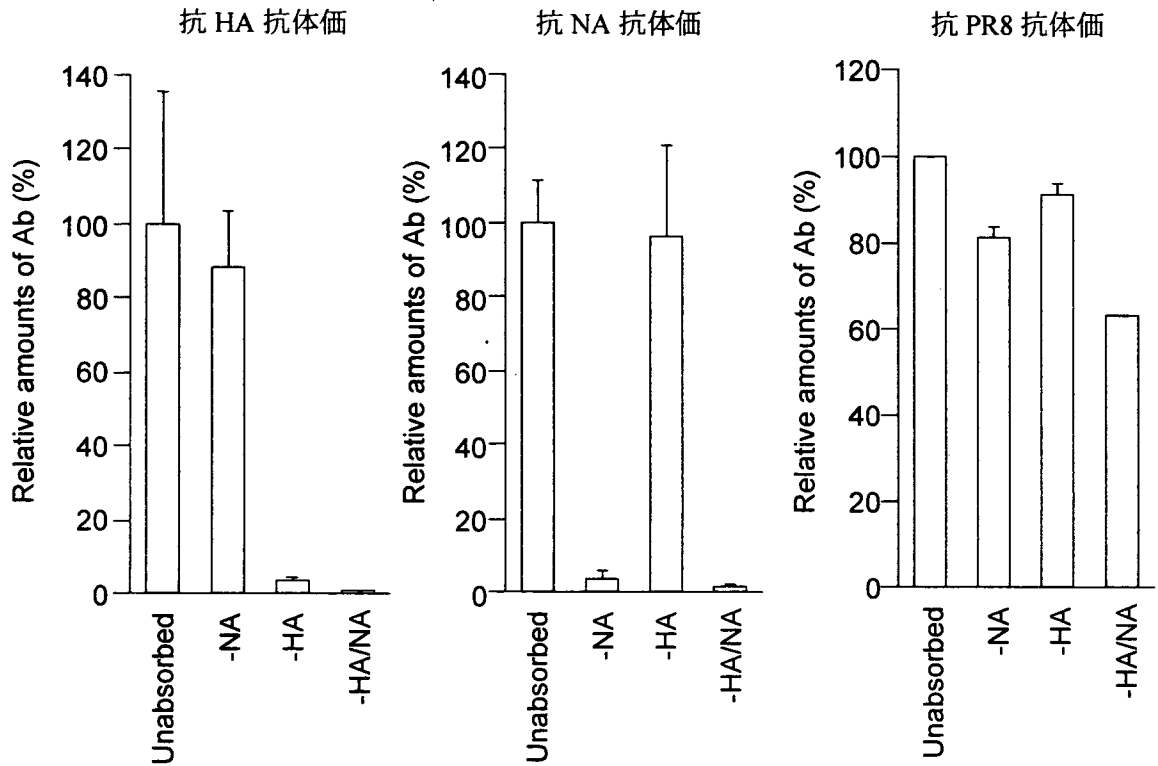
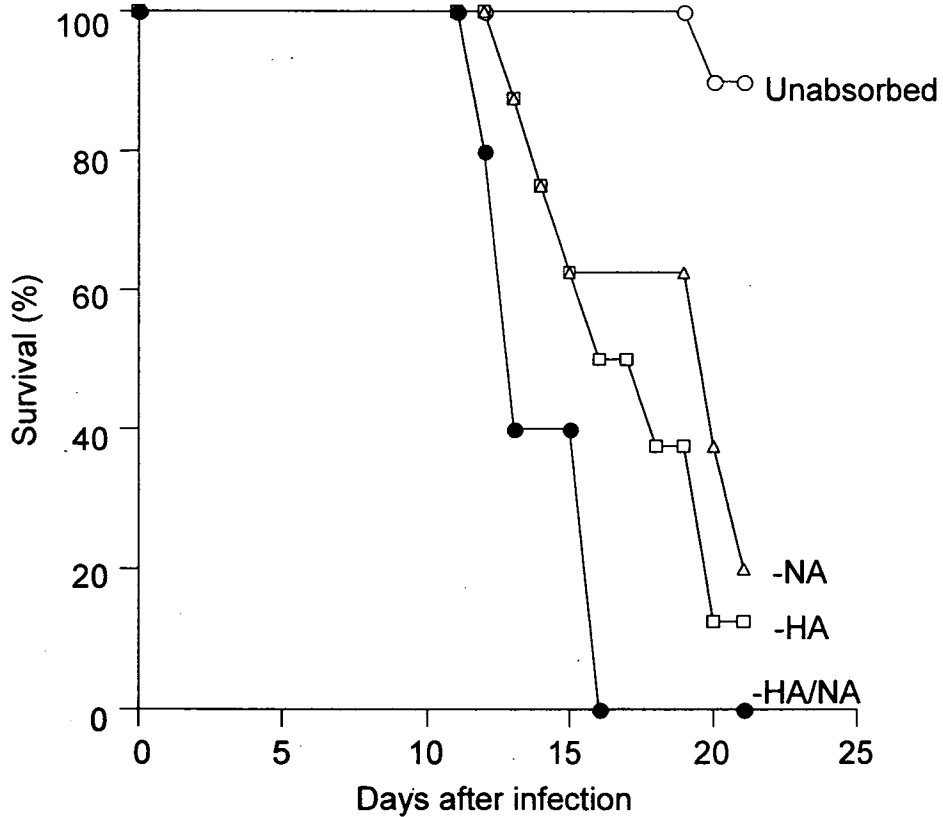


図6 抗HA/NA抗体除去による感染防御能の変化



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
	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	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、ネコ及び各種動物由来培養細胞での強毒型及び弱毒型ウイルスの増殖性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を行った。鳥類由来ウイルスが弱毒強毒型に関わらずネコ由来培養細胞でよく増殖することがわかった。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があるとされている $\alpha 2\text{-}3$ 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、実際のウイルス増殖、また、ウイルスの複製や出芽段階での宿主要因についても解析が必要と考えられた。

A. 研究目的

H5N1 亜型インフルエンザ A 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。また、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 $\alpha 2\text{-}3$ 結合の分子を、

ヒト由来のウイルスは $\alpha 2\text{-}6$ 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. 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、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 と 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。

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

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 $10^{3.85} \sim 10^{4.56}$ 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)。

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 3)。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 3)。これらの結果はネコの気管細胞には α 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 α 2-3 と α 2-6 または α 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 4)。

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。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培養細胞の CRFK、fcwf-4、AK-D、Fc3Tg の4種類の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鳥類由来インフルエンザウイルスが増殖した。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。

ネコの各所組織におけるシアル酸分子の解析を行ったところ、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され出来ていないが、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、さらにネコの他の組織における受容体の分布を検索することや、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と考えられた。

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。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。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

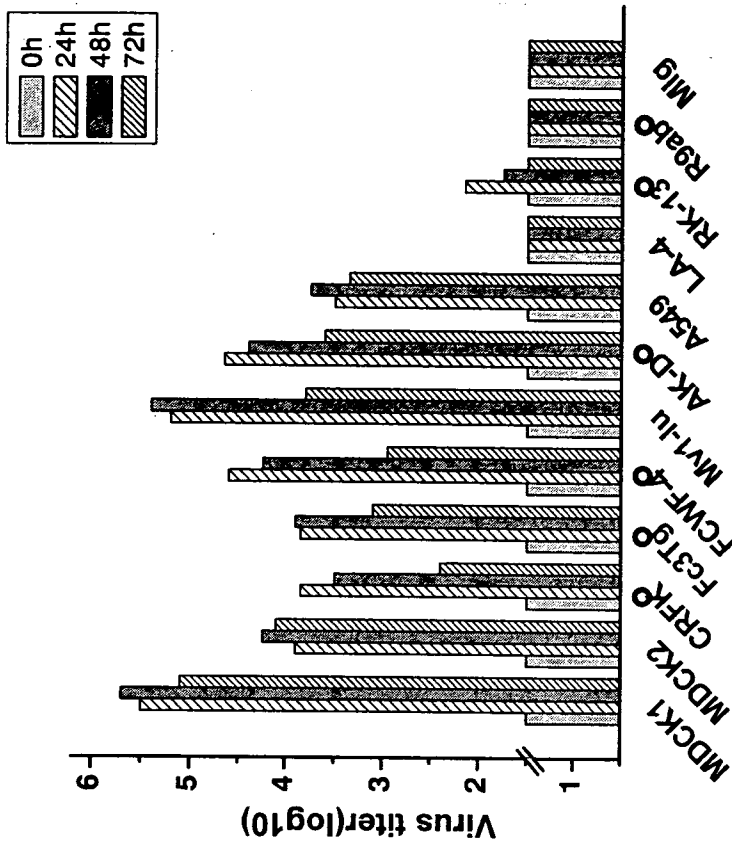
G. 研究発表

- 1) Kyoko Sawabe, Keita Hoshino, Haru-hiko Isawa, Toshinori Sasaki, Toshihiko Hayashi, Yoshio Tsuda, Hiromu Kurahashi, Kiyoshi Tanabayashi, Akitoyo Hotta, Takehiko Saito, Akio Yamada and Mutsuo 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.* 75:327-332, 2006.
- 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, 小渕正次, 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.

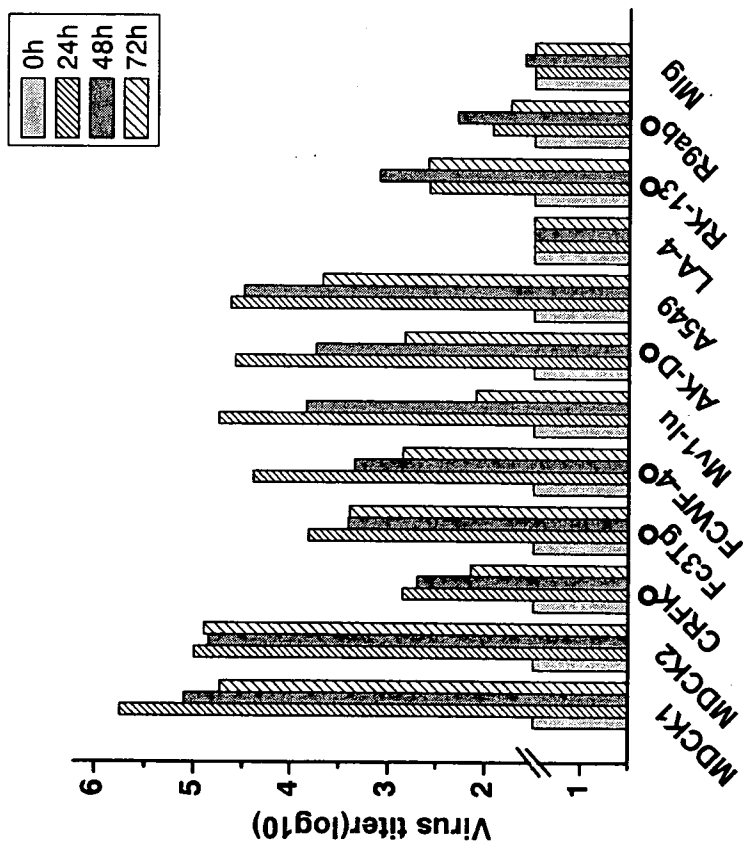
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

Moi 0.01

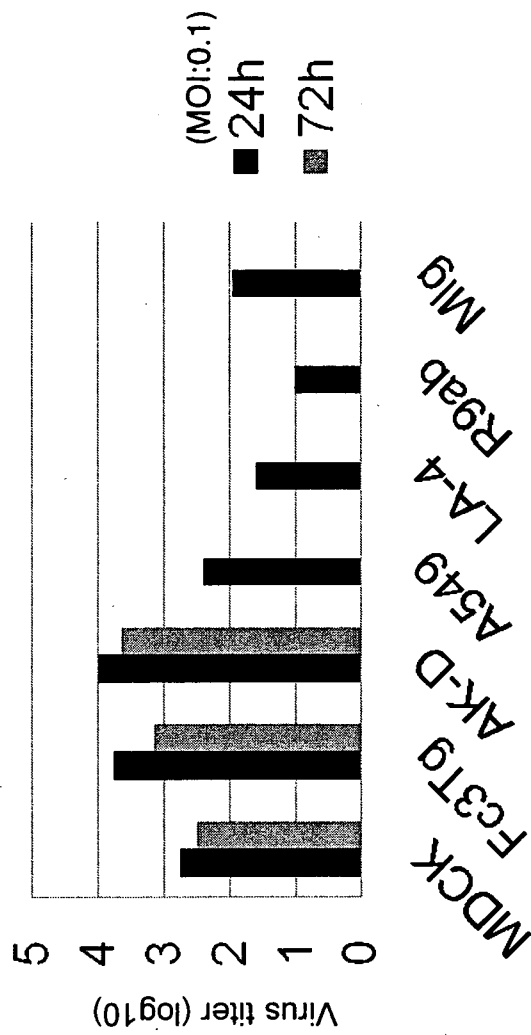


Moi 0.1



	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

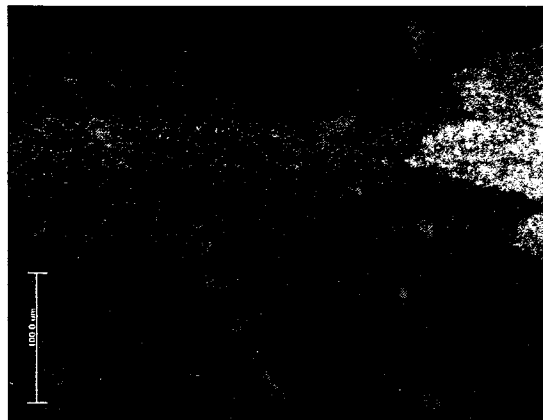
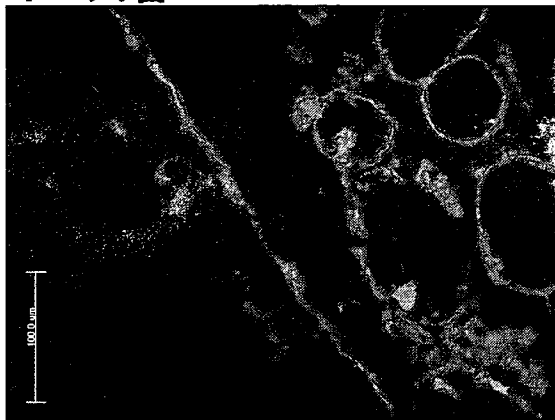
図1. 各種培養細胞での弱毒型鳥類由来インフルエンザウイルスの増殖



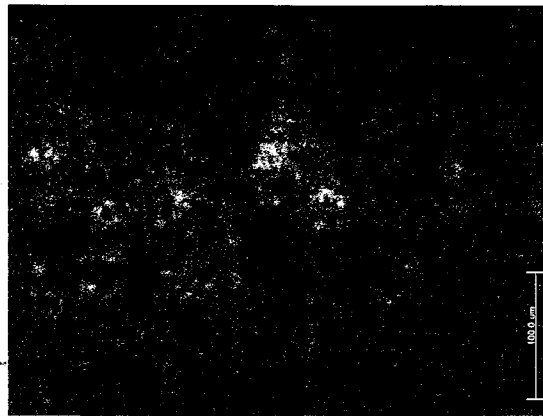
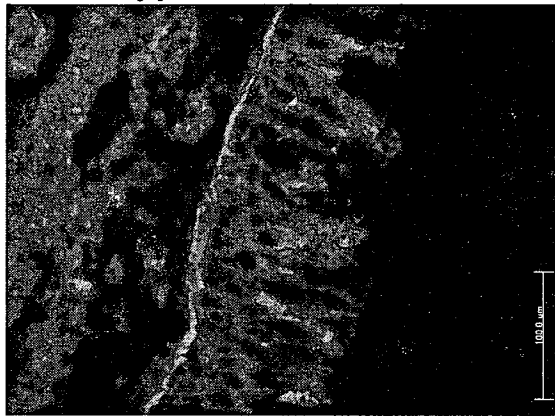
各細胞2穴における感染価をMDCK細胞で測定しその平均値を $10^{\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}}$ として表した。ウイルスはA/lowfly/Kyoto/93/2004 (H5N1)でトリプシンは添加せずに実施した。

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

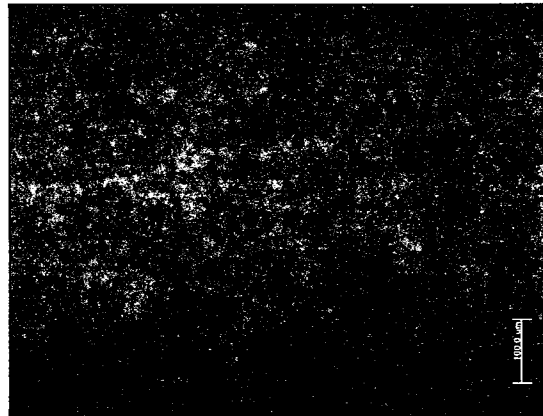
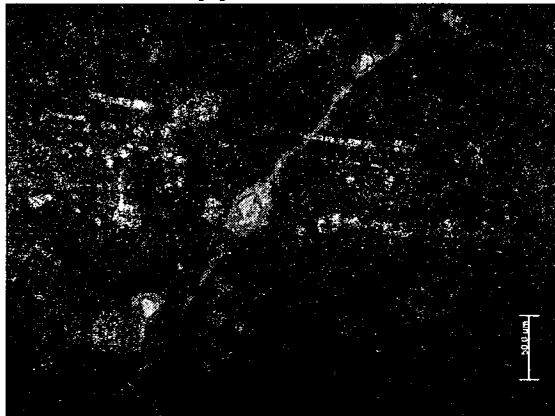
ネコ気管



ブタ気管



ニワトリ気管

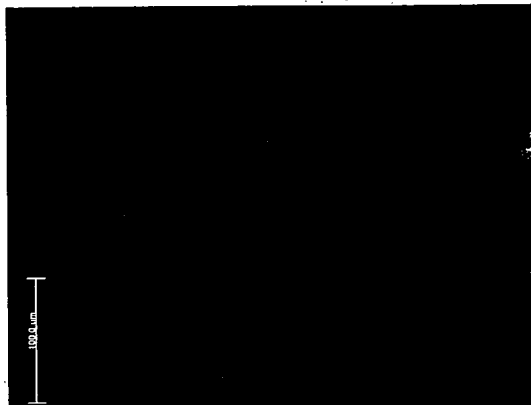


SNA($\alpha 2-6$)

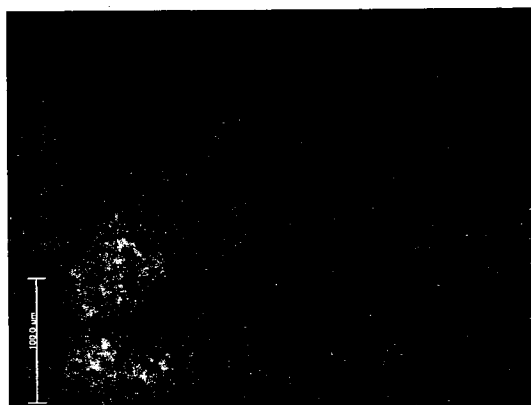
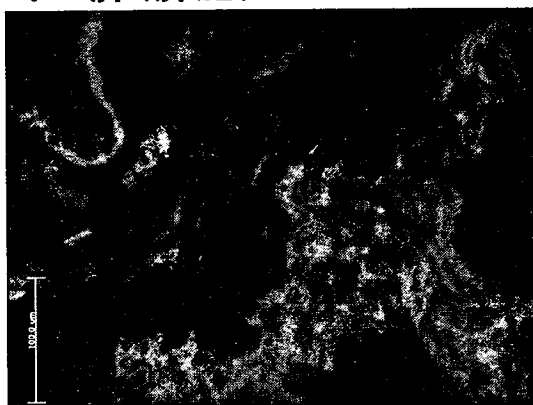
MAA($\alpha 2-3$)

図3:ネコ、ブタおよびニワトリ気管におけるSNAおよびMAAL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)

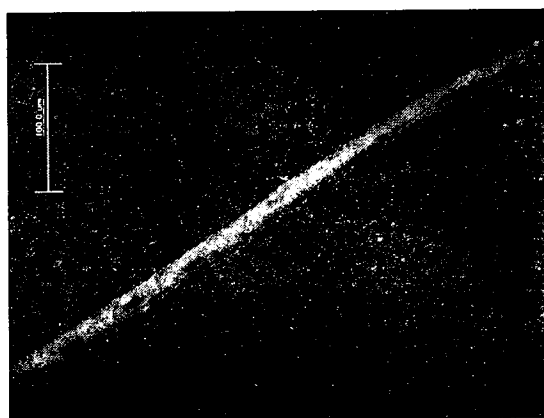
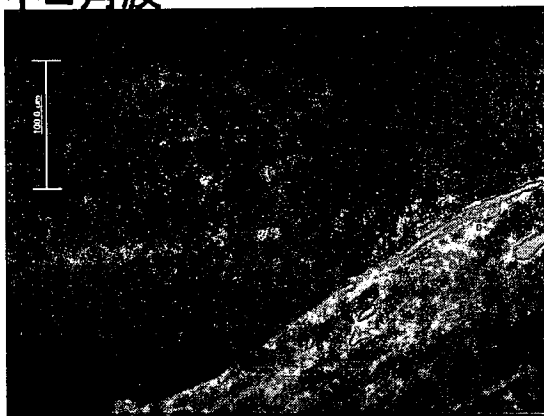
ネコ肺(細気管支)



ネコ肺(肺胞)



ネコ角膜



SNA(α 2-6)

MAA(α 2-3)

図4:ネコ肺および角膜におけるSNAおよびMAAレクチンの反応(α 2-6結合シアル酸はFITC-SNAにより緑に α 2-3結合シアル酸はTRITC-MAAにより赤く染色されている)

平成 17-19 年度厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担総合研究報告

高病原性鳥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

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)
津田 良夫 (同・昆虫医科学部 室長)
林 利則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)
駒形 修 (同・昆虫医科学部 流動研究員)
葛西真治 (同・昆虫医科学部 主任研究官)
富田隆史 (同・昆虫医科学部 室長)
倉橋 弘 (同・昆虫医科学部 客員研究員)
二瓶直子 (同・昆虫医科学部 客員研究員)
斉藤康秀 (麻布大学獣医学部)
中口 梓 (同・昆虫医科学部 流動研究員)
金 京純 (同・昆虫医科学部 研究生)
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)
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:

- 1) ウイルスを摂食したオオクロバエの実験において 14 日間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。
- 2) 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。
- 3) 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。

4) フェニトロチオンとペルメトリンのオオクロバエ (*Calliphora nigribarbis*) に対する有効性を調査した結果、局所施用法による殺虫試験によって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 µg/fly と 0.0136 µg/fly であり、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が示された。

5) ピレスロイド系殺虫成分のペルメトリンをその繊維の中に含むオリセットネット（蚊帳）の畜舎への設置がオオクロバエの防除に有効であるかを検討し、接触による半数致死時間は、雌では約30秒、雄では30秒以内と推定された。

6) 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、H5N1亜型ウイルス強毒株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結果、強毒株のクロバエ体内でウイルスの生存時間は24～48時間であることが分かった。また、オオクロバエを約6週齢のニワトリが入ったケージに放したところ、全てのハエが捕食されたことから、ニワトリは好んでハエ類を捕食することが確認された。

A. 研究目的

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。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。なお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名が死亡している。

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種類のクロバエ類から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(Sawabe et al., 2006)、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。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、H5N1亜型強毒株ウイルス液を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。また、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。

野外におけるオオクロバエの生態を明らかにする目的で、冬に繁殖し、日中活発に飛び回る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を行った。調査地として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。

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。

野外で捕獲したオオクロバエを直接用いて、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薬剤である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の値と比較して評価した。

ペルメトリンをその繊維の中を含むオリセットネットと同等な性状と機能をもつ防除ネットが鶏舎におけるハエ類の侵入の防衛手段として有効であるかを評価するために、オオクロバエを用いオリセットネットの殺虫効力に関する試験を行った。

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

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を用いた。ウイルス液の初期力価(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* を実験に供した。

3) クロバエへのウイルス摂食実験

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、ウイルス液をオオクロバエに約 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 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軽く遠心後上清を回収し、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し、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カ

価を算出した。

2. 標識・放逐・再捕獲法によるオオクロバエの飛行行動の解析

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。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した。オオクロバエの活動は冬期に活動するため、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。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。

3. 高病原性鳥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

野外で捕集したオオクロバエを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、それらを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。A 型インフルエンザウイルス検出用プライマーを用い、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。

4. オオクロバエの殺虫剤感受性

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 度に保ち砂糖と水を与えられ、生残したハエの数を 24 間後に数えた。LD50 は SPSS (SPSS Inc.) により計算した。

5. オリセットネット限定時間接触試験

—麻酔下: 予め炭酸ガスで十分に麻酔させたハエをピンセットを用いて数頭毎にオリセットネット処理面に移し、ハエは腹面を下にしてオリセットネットの上に置き、一定時間接触させた後、ナイロンメッシュケージに移し、24 時間後の死亡 (ノックダウンを含む) を観察した。

—麻酔なし: 炭酸ガス麻酔下で雌雄を分

別し、麻酔後 1 時間以上経過し完全に麻酔から覚醒したハエを供試した。オリセット ネット・ケージにハエを投入し、一定時間後に回収し、ナイロンメッシュケージに移し、水を与え、24 時間後の死亡（ノックダウン含む）を観察した。ハエのオリセット ネット・ケージへの投入と取り出しは吸虫管を用いて 1 頭毎に行った。オリセット ネットは約 60 頭の試験を終える毎に、新しいネットに交換した。

プロビット解析： バイオアッセイのプロビット解析には SPSS ver.10 (SPSS Inc.) を使った。

6. 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℃の温度に慣らしおき、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（麻布大学で実施）。

C. 結果

1-1. 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された。オオクロバエの摂食後 24 時間までのそ囊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、そ囊および腸管のいずれからウイルスは分離されなかつ

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℃）に 14 日間維持した後のクロバエからは、そ囊・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、摂食直後はそ囊で 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ウイルス力価は減少し、24 時間後にはそ囊で 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つた。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℃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} TCID₅₀/0.05ml）は高く維持されていた。

一方、RT-PCR による遺伝子の検出は、そ囊・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。

1-2. 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} EID₅₀/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} EID₅₀/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。

2. 標識・放逐・再捕獲によるオオクロバエの飛翔行動解析

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。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、最も高い地点で 107.3 個体/時間、もっとも密度が低かった地点は 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 1,111 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たところ、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、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 日目に放逐され 2 日目に捕獲された個体の 2 km 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) を求めたところ、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。

3. オオクロバエからのインフルエンザ A ウイルスの検出

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。

4. オオクロバエの殺虫剤感受性

フェニトロチオンとペルメトリンに関する LD50 値は、それぞれ、0.078 μg と 0.014 μg 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、得られた応答は有意水準 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。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、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。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 1 個体あたりで求めた 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。

5. オリセットネットの殺虫効果

1) ペルメトリン局所施用試験

雌と雄に対するペルメトリンの LD50 値は、それぞれ、0.114 µg/fly と 0.106 µg/fly であった。プロビット回帰の直線性から有意に外れたため、信頼限界の推定はできなかったが、LD50 値に大きな性差はなかった。試験に用いた出水コロニーの雌と雄の羽化後 10 日目の平均体重(144.9 mg, N=64; 127.0 mg, N=103)に基づき、体重あたりの値に LD50 を換算すると、雌雄それぞれ、0.788 µg/g と 0.838 µg/g となった。一方、イエバエの殺虫剤感受性 SRS 系統の雌の体重あたりのペルメトリン LD50 値は、0.350 µg/g と推定されている(Komagata et al. 2006)。

2) オリセットネット継続接触試験

オリセットネット・ケージに雌を閉じこめて自由に行動させ、一定時間間隔でノックダウンを観察した。試験を 10 回反復して得た KT50 の平均値は 324.7 sec (SD=23.9 sec) であった。

3) オリセットネット限定時間接触試験—麻酔下

麻酔を施したハエの腹面をオリセットネットに一定時間接触させ、24 時間後の死

亡を観察した。接触時間 60 秒と 120 秒では、雌と雄のいずれも正常虫数が死虫数を上回り、効力が十分に表れないことが示された。一方、雄に対する接触効果は雌に対する効果より大きい傾向が認められた。

4) オリセットネット限定時間接触試験—麻酔なし

麻酔を施していないハエをオリセット・ケージ内に放ち、一定時間後に回収し、24 時間後の死亡を観察した。雌の LT50 値は 29.7 sec (95% CL: 23.2 - 36.9 sec) と推定された。雄では設定した内で最短の接触時間 15 秒ですでに 90% の死亡率を示したために LT50 値を求めることができなかったが、雄の LT50 値は 15 秒以内と表される。本試験における雄の雌に比した効力の高さは、上に述べた局所施用試験と麻酔下限定時間接触試験の効力に示された性差では説明が難しい。60 秒間と 120 秒間オリセットネットにハエを接触させた場合、麻酔をかけないハエの方が麻酔下のハエよりも明らかに殺虫効果が高かった。この違いは、ハエがネットの上を歩行することによりペルメトリンを脚により多量に付着したことによるものと説明できる。

6. 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., 投稿中)。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性があると言えよう。

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、その渡り鳥の飛来地から鳥インフルエンザ発生農場へ、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。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)。飛翔行動の観察から約200 kmの対馬海峡を10時間程度で渡ることも可能かもしれない。

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るという事実は、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、生きた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。一方、オオクロバエの殺虫剤感受性に関して、フェニトロチオンとペルメトリンの2種類の薬剤で調べたが、薬剤の散布濃度以下で高率に殺虫させることが可能なことが明らかとなった。また、ペルメトリンを含む繊維で織られたオリセットネットを用いた殺虫試験においても効力が確認され、密閉鶏舎の入り口等の開口部に設置することによって、効率よくクロバエ類を防除または侵入を阻止できる可能性が示唆された。

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。

5) 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。

6) 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ンとペルメトリンに対し、感受性であった。

7) オオクロバエ成虫がオリセットネット上に留まる際の半数致死時間を 30 秒またはそれ以内と推定した。オリセットネットを利用する防護ネットが畜舎に飛来するオオクロバエの防除に有効である可能性が室内試験の範囲で示された。))

8) 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を確認された。

F. 健康危険情報

なし

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) Komagata O, Kasai S, Tsuda Y, Kobayashi M, Tomita T (2006) Insecticide susceptibility of the blow fly, *Calliphora nigribarbis* Vollenhoven, *Medical Entomology and Zoology*, 57: 205-209..

3) 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.

4) 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