

研究1：「被災地におけるインフルエンザ流行に関する検討」

鈴木陽、神垣太郎、当廣謙太郎、押谷仁

=== 1. 分子生物学的解析 ===

A. 研究目的

自然災害後には、劣悪な生活環境や心理的なストレスよりさまざまな感染症が流行する事が危惧され、インフルエンザもその代表格として挙げられる。そのような非日常的な状況下における感染症対策として症候群サーベイランスが行われる事があっても、病原体の特定が行われる事は非常に希である。その理由のひとつとして、病原体検査体制の不備があげられる。そのような背景より、自然災害後の病原体別の疫学に関する知見は限られている。

東日本大震災は仙台市内および周辺地域でインフルエンザが流行している最中の2011年3月11日に発生した。しかし、医療機関の被災、検体輸送が困難であった事より、通常のインフルエンザサーベイランスは機能が保てなくなり、被災地におけるインフルエンザの流行状況を把握する事が不可能となった。そこで、我々研究室独自の研究ネットワークを活用し、震災直後の被災地におけるインフルエンザウイルス流行をモニタリングした。

B. 研究方法

東日本大震災直後の3月15日から2ヶ月後の5月19日まで、宮城県内の避難所および仙台市急患センターや開業小児科医療機関にてインフルエンザが疑われた患者より検体採取を行った。検体輸送はスタッフ自らが行った。検体保存が可能な状況下では咽頭・鼻腔内ぬぐい液の採取を行い、それが困難な場合はインフルエンザ迅速診断キットの抽出液の残液を収集した。それらを

材料とし conventional one-step RT-PCR もしくは real-time one step RT-PCR によるインフルエンザウイルスの検出を行った。陽性検体に関しては赤血球凝集素 (Haemagglutinin: HA) 部分遺伝子の解析を行った。インフルエンザウイルスの分離体制が整備された3月24日以降は、マイナス80℃に保存していた検体をMDCK細胞に接種しウイルス分離を行った。細胞変性効果陽性検体については、赤血球凝集阻止 (HI) 試験にてウイルス同定を行った。

C. 研究結果

震災発生後の2011年第11週から第20週までに、仙台市及び周辺地域より計251検体を収集した(表1)。震災直後は、避難所や東北大学病院の急患センターから検体を収集していたが、5週目以降は仙台市急患センターや外来小児科施設から採取した検

表1.ウイルスモニタリング施行医療機関における採取サンプル数

	避難所	東北大学 急患センター	仙台市 急患センター	外来小児科機関	合計
11th week (3/14-3/20)	6	34	16	4	60
12th week (3/21-3/27)	16	0	10	2	28
13th week (3/28-4/3)	6	0	13	8	27
14th week (4/4-4/10)	5	5	4	11	25
15th week (4/11-4/17)	0	0	12	7	19
16th week (4/18-4/24)	0	0	5	16	21
17th week (4/25-5/1)	0	0	19	53	72
18th week (5/2-5/8)	0	0	14	2	16
19th week (5/9-5/15)	0	0	2	5	7
20th week (5/16-5/22)	0	0	0	2	2
合計	33	39	95	110	277

体が主となった。

それらの検体より、インフルエンザウイルス A (H3N2) が 112 件、A (H1N1) pdm2009 が 1

件、B が 80 件検出された。震災直後より A (H3N2) の流行が見られ、4 月中旬より B の流行が観察された。(表 2)

表2.ウイルスモニタリングからのインフルエンザウイルス検出

検体採取日	インフルエンザウイルス検出数*			サンプル数
	A(H3N2)	A(H1N1) pdm 2009	B	
11th week (3/14-3/20)	22	1	2	60
12th week (3/21-3/27)	23	0	0	28
13th week (3/28-4/3)	20	0	4	27
14th week (4/4-4/10)	18	0	1	25
15th week (4/11-4/17)	9	0	9	19
16th week (4/18-4/24)	4	0	15	21
17th week (4/25-5/1)	12	0	49	72
18th week (5/2-5/8)	4	0	8	16
19th week (5/9-5/15)	0	0	4	7
20th week (5/16-5/22)	0	0	0	2
合計	112	1	92	277

A (H3N2) の HA1 領域(781bp) による系統樹解析においては、2010-2011 年前半に当研究室にて分離された A (H3N2) はほぼ全て Victoria group に属していたが、震災後に検出された株の多くが Perth group に属していた(図 1)。HI 試験の結果、2010/11 シーズンのワクチン株との抗原性の変化は見られなかった。

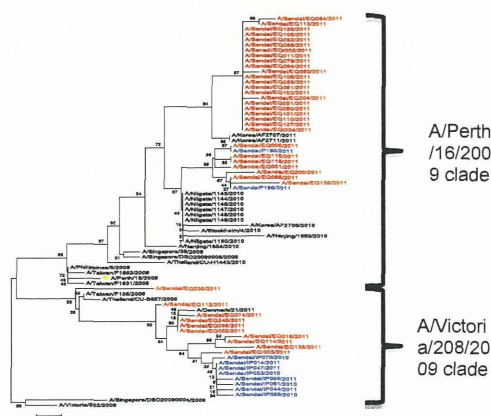


図 1 A 型インフルエンザウイルス (H3N2) の系統樹

一方、仙台市内の学校が再開した 4 月中旬より小学校で B のアウトブレイクが観察された。Victoria 系統株が主であったが、西日本からボランティア活動のために来仙していた患者より Yamagata 系統株が検出された。(図 2)

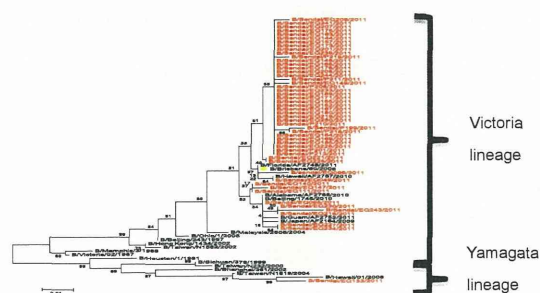


図 2 B 型インフルエンザウイルスの系統樹

D. 考察

今回の震災は、宮城県および周辺地域の A 型インフルエンザウイルス (H3N2) 流行に重なってしまった。しかし、震災後の混乱のため通常のインフルエンザサーベイランスが十二分に機能せず、正確な流行状況を把握する事が出来なかった。当研究室の器材の破損はほとんどなかったため、被災 3 日目から PCR およびシーケンサーの稼働を確認し、検査体制の立て直しを行った。また、これまでインフルエンザ関連の共同研究を行ってきた研究ネットワークを活用する事で、流行の規模は測れないものの、流行株のモニタリングを実施する事が可能となった。

被災直前から流行していた A (H3N2) は、5 月に入るまで流行していた。震災前後で系統樹上では流行株の変化が生じていたが、抗原性の変異等は見られなかった。

一方 B においては、学校が再開された復興期において流行がはじまった。これは、震災直後は社会活動が制限されたため social distancing と同等の状況下にあったが、学校の開始と同時に学童を中心に流行したと考えられる。また、ボランティアによる外部から被災地へのウイルスの持ち込みが確認された。感染症対策は被災者が中心となっているが、今後は被災地を訪れる人々の健康管理にも注意をはらう必要性がある。

E. 結論

東日本大震災の経験より、復興活動によるウイルスの伝播や復興期におけるウイルス流行の可能性が示唆され、災害直後のみならず復興期においてもウイルスモニタリングが重要であると考えられた。

=== 2. 疫学解析 ===

A. 研究目的

避難所においては非常に密集した状況下での生活を強いられるため、感染症が持ち込まれると急速に拡大してしまう可能性が考えられる。東日本大震災が宮城県内でインフルエンザが流行している時期に発生したため、避難所におけるインフルエンザ感染対策が急務となった。そこで、東日本大震災の津波の影響で避難所での集団生活を強いられた宮城県の山元町において各避難所における感染症対策をサポートすると同時に、集団発生の事例の解析を行った。

B. 方法

2011 年 3 月 18 日から 4 月 9 日までに、東北大学微生物学分野のスタッフが山元町の

避難所をおとずれ、臨床症状よりインフルエンザを疑われた患者を対象に聞き取り調査を行った。それらの患者より、年齢、性別、発症日、家族構成、避難所での生活場所に関する情報収集を行った。発症日が 3 日以内であれば患者間で疫学的関連性があると仮定し、部屋、家族構成と発症の関連について統計ソフト「R 2.14.0 iGraph」を用いて解析を行った。

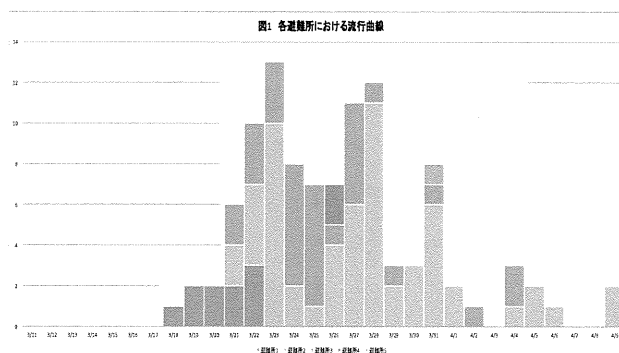
C. 結果

山元町 5 ヶ所の避難所にて 3 月 23 日から 4 月 11 日の間に合計 105 例のインフルエンザ症例の発生を確認し、聞き取り調査を行った(表 1)。

表1各避難所におけるインフルエンザ患者数

避難所	初発患者発症日	避難者数	インフルエンザ患者数	発症率(%)
避難所1 老人ホーム	3月18日	130 ¹⁾	10	7.7
避難所2 コミュニティーセンター	3月21日	533	60	11.3
避難所3 中学校	3月21日	524	31	5.9
避難所4 中学校	3月26日	117	2	1.7
避難所5 コミュニティーセンター	3月28日	207	2	1

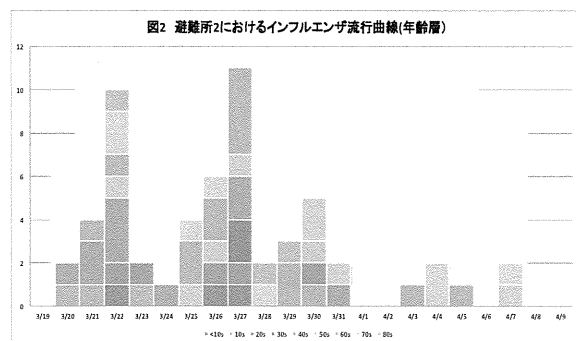
インフルエンザは、被災から 1 週間以降に、各避難所へ持ち込まれていた(図 1)。



本来コミュニティーセンターであった避難所 2 のみ全避難者の年齢に関する情報を入手できた。避難者全体 47%が 60 歳以上（中央値 58 歳）と高齢者の割合が高く、それに合わせるように発症者の 44%が 60 歳以上であった。年齢と発症日の関連をみると、青

年層が早期に発症し、その後高齢者に移行していた(図2)。

この傾向は、避難所3でも確認された。更に、すべての避難所での初発例は30代の男性であった。



避難所2および3における発症者の関連をEpidemic tree法を用いて図式化してみると、発症者間で「同室者」および「家族内感染」のリンクがインフルエンザの感染伝播を説明しうることが確認された。

D. 考察

当研究室がおこなった感染症アセスメントによると、東日本大震災後に感染症対策が必要な病原体としてインフルエンザウイルスおよびノロウイルスおよびロタウイルスが挙げられた。

宮城県内でのインフルエンザの流行時期に一致して、山元町の避難所内にもインフルエンザが持ち込まれていた。それぞれの施設内で患者隔離等の感染対策を施行していたためか、発症率が最大11%と爆発的な流行にはいたらなかった。発症者の属性をみると、全体の年齢層が高いことを反映して高齢者の発症が多かったが、すべての避難所において初発症例は青年層の男性であった。これは、それらの年齢層が外部と接触する機会が一番多かったためと考えられる。

E. 結論

高齢者が多い避難所におけるインフルエンザ対策として、外部と接触する機会が多い青年層の男性の健康管理が重要である。

研究2：「インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の分子進化」

Irona Khandaker、鈴木陽、岡本道子、押谷仁

A. 研究目的

A(H1N1)pdm09 は、2009 年の世界的流行の後にも複数シーズンにわたり地域的流行を起こしている。大多数の人がこのウイルスに対して免疫を持たないため、このウイルスの経時的な変異を観察する事で、集団免疫に関連する抗原決定部位などの変異が観察できる可能性が高い。そこで、本研究では、2009 から 2011 年までに仙台市内で流行した同ウイルスの HA および NA 遺伝子の解析を行い、同ウイルスの遺伝子の進化について観察した。

B. 研究方法

2009 年の 9 月から 2011 年の 4 月までの期間、仙台市内の小児科外来施設においてインフルエンザ様疾患患者から咽頭拭い液を採取し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。赤血球凝集阻止試験にてインフルエンザウイルスの同定を行った後、HA および NA 遺伝子の塩基配列を確定し、HA1 (52-1029 nt) および NA (1-1395nt) 遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

同研究期間中に分離同定された 75 の分離株を対象に遺伝子解析を行った。ウイルスの進化速度を比較すると、2009-2010 シーズン (1.5×10^3 /substitutions per site per year) より翌 2010-2011 シーズン (1.6×10^3 /substitutions per site per year) の方が変化に富んでいた。

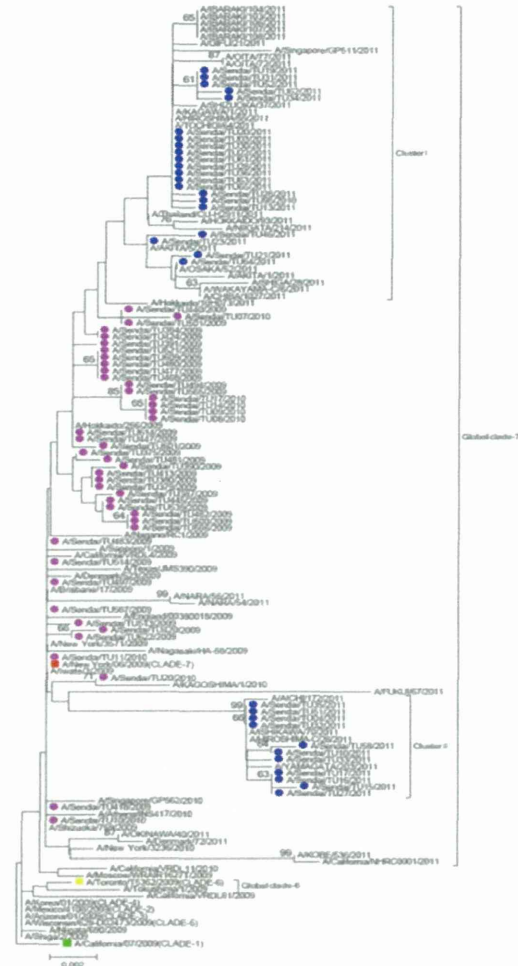


図 1 HA1 遺伝子の系統樹 (NJ 法)

Neighbor-Joining 法により作成した HA1 (図 1) および NA の系統樹では、それら分離株は HA1 に S203T の変異を共有する Clade7 に分類された。しかし、2009 年の分離株の NA 遺伝子のみ、Clade6 に分類された。また、2009-2010 シーズンの株は系統樹上で分散している一方で、2010-2011 シーズンの分離株は、2つのクラスターに分かれていた。

HA1 遺伝子の解析では、A141V、S143G、S183P、S185T および S203T などの抗原決定部位およびレセプター結合部位に変異を認めた。いずれの分離株も NA 阻害剤の耐性に関わる変異は持っていなかった。HA1 の 197 番目および NA の 46 番目が正の選択圧を受けていた。

D. 考察

A(H1N1)pdm09 の変異を観察する事は、ウイルスの進化を知る上で非常に重要である。2009 年の分離株が複数のクラスターに分かれていたのは、異なる経路を経て仙台市内に持ち込まれた事を示している。抗原決定部位の変異をみると、2009 年は少なかったものの、2011 後半にかけて増加していた。これは、ウイルスの流行に伴い集団免疫が生じたからと考えられる。正の選択圧を受けていた HA1 および NA の部位も、同様メカニズムによると考えられる。

E. 結論

今後も、ウイルスの変異を地域レベルで観察し、ウイルスの進化を追いつける必要がある。

研究 3 : 「B 型インフルエンザウイルスの Restriction Fragment Length Polymorphism」

岡田貴志、鈴木陽、岡本道子、押谷仁

A. 研究目的

B 型インフルエンザウイルスは抗原性の違いにより、山形系統とビクトリア系統に分類される。本研究では臨床検体から直接 B 型インフルエンザウイルスの同定が可能となる Restriction Fragment Length Polymorphism の確立を試みた。

B. 研究方法

山形系統およびビクトリア系統の HA 部分を特異的に切断する制限酵素が無かった為、PCR プライマーにミスマッチを入れ PCR 産物に制限酵素認識部位を作成した。PCR 産物は、山形系統は SmaI、ビクトリア系統は ApaI で 170bp および 30bp に消化されるようにした。

標準株として、2007-2008 シーズンに仙台市内の小児外来施設で採取した咽頭拭い液から分離した B 型インフルエンザウイルスを用いた。また、臨床検体として、2011-2012 シーズンに仙台市内で小児外来施設にて採取され、B 型インフルエンザウイルス分離同定された咽頭拭い液を使用した。それらの検体より RNA を抽出後、Unill(Dapat C et al, 2009) にて complementary DNA を作成した。アウタープライマー(Tsai HP et al, 2006) で 1st PCR を行った後、制限酵素認識部位を含む RFLP 専用プライマーで nested PCR を行った。PCR 産物は 4% アガロースで電気泳動を行い、制限酵素での処理を確認した。

C. 研究結果

山形系統およびビクトリア系統の臨床分離株を用いて各々の系統の RFLP

専用プライマーで PCR を行くと、両系統はともに増幅されるが、その産物は各々の制限酵素でのみ消化され、反応の特異性を確認した。また、これらの PCR 産物に変異が挿入された事をシーケンスでも確認した。

RFLP 専用プライマーのみの PCR と比較すると、アウタープライマーを使用した nested PCR では検出感度が 10 倍増加し 10^2 TCID まで検出可能となった。

2011-2012 シーズンのビクトリア系統 46 件および山形系統 2 件の臨床検体を対象に nested PCR をおこなったところ、前者で 40 件、後者で 1 件が陽性となった。全 41 検体において、臨床分離株と同様に各々の系統の RFLP 実験系でのみ PCR 産物が消化された。

D. 考察

山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した。ウイルスの分離やシーケンスを行わずして、B 型インフルエンザウイルスの系統の判別が可能となった。また、アウタープライマーを併用した nested PCR によって臨床検体の約 85% で増幅が可能であった。しかし、一部検体においては、nested PCR より分離効率が勝っていた。この方法は塩基配列に特異的であるため、変異の挿入に注意が必要である。

E. 結論

臨床検体から直接、山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した。

研究4：「仙台市とフィリピンで流行した Influenza C virus の流行動態把握とウイルスの性状比較および分子進化の検討」

小田切崇、岡本道子、押谷仁

A. 研究目的

Influenza C virus (FluC)は上気道炎の起因ウイルスの1つであり、我が国では1年おきに流行することが知られている。しかし日本以外での検出報告は極めて少なく、未だその実態は不明な部分も多い。本研究では2011年にフィリピンで初めて分離に成功した事例を含め、仙台(日本)とフィリピンで検出されたFluCの抗原性やウイルス学的性状を解析した。

B. 研究方法

2008年から2012年に急性呼吸器疾患で仙台市内の小児外来施設を受診した患者から咽頭拭い液を採取した。フィリピンでは2009年から2013年に医療機関においてインフルエンザ様疾患および重症肺炎と診断された小児から鼻咽頭拭い液を採取した。MDCK細胞に接種後、FluCが分離できた検体に関し、再度検体を発育鶏卵に接種しウイルスを分離した。抗原解析はモノクローナル抗体による赤血球凝集阻止試験にて行い、その後HEおよび内部遺伝子の塩基配列を確定し、遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

同研究期間中仙台では2008年と2012年に計7株、フィリピンでは2011年と2013年に計12株のFluCの分離に成功し、これら19株を対象に抗原解析と遺伝子解析を行った。仙台、フィリピンともに全ての分離株がサンパウロ系統に属しており、研究期間中に両国内でのウイルスに抗原性の変化はなかった。Neighbor-Joining法で作成したHE(図1)の系統樹でも、全ての分離株がサンパウロ系統に属することが裏付けられたが、仙台株とフィリピン株では異なるSub-cladeに分けられた。また内部遺伝子の系統樹解析から、研究期間中に分離された19株は全てリアソータントであった。加えて、PB2、NP遺伝子で仙台株(2008、2012年)とフィリピン株(2011、2013年)とが異なる系統に属したことから、仙台株とフィリピン株は異なるリアソートメントを起こしながら、それぞれの地域で流行していることが判明した。

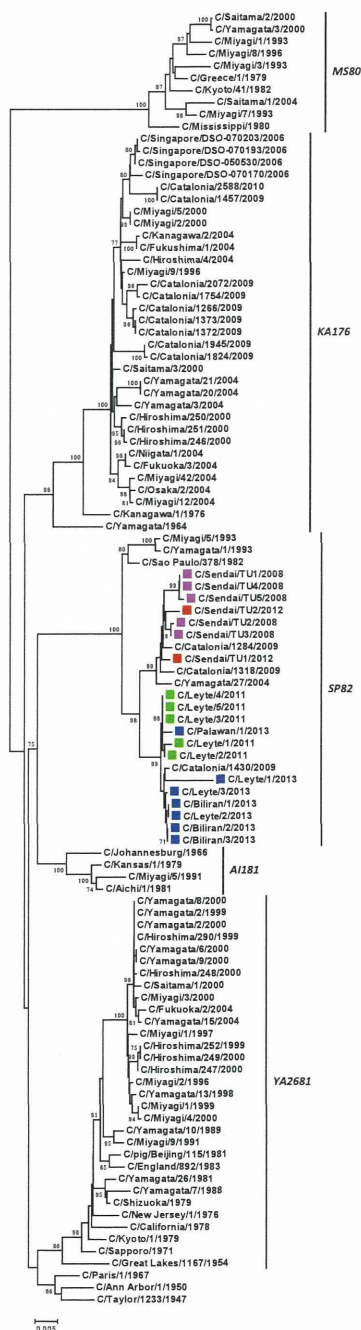


図 1 HE 遺伝子の系統樹 (NJ 法)

D. 考察

日本では 1 年おきに流行すると考えられている FluC だが、これまでの観察から日本のみでなく熱帯地域に属するフィリピンでも 1 年おきに流行する可能性がある。

2011、2013 年のフィリピン株はウイルスの内部遺伝子構成が 2000 年に流行がみられた神奈川系統のウイルスの内部遺伝子構成と同じであったことから、リアソートメントがフィリピンで起きたと仮定すると、同じ遺伝子構成をもつ株がフィリピンでも存在していた可能性が示唆された。

E. 結論

FluC は乳幼児感染において重篤な肺炎症状を引き起こす可能性があることから、その流行動態を明らかにすることは公衆衛生上、非常に重要である。日本とフィリピンの FluC は、内部遺伝子は異なるものの、同じ抗原性を持つウイルスが検出されていることから、A 型、B 型とともに FluC のモニタリングもまた重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tohma K, et al. Monitoring of Influenza Viruses in the Aftermath of the Great East Japan Earthquake. Jpn. J. Infect. Dis., 65, 542-544, 2012.

2. Kamigaki T, Seino J, Tohma K, Nukiwa-Soma N, Otani K, Oshitani H. Investigation of an Influenza A (H3N2) outbreak in evacuation centres following the Great East Japan earthquake, 2011. BMC Public Health. 2014 Jan 14;14(1):34. doi: 10.1186/1471-2458-14-34.

3. Khandaker I, Suzuki A, Kamigaki T, Tohma K, Odagiri T, Okada T, Ohno A, Otani K, Sawayama R, Kawamura K, Okamoto M, Oshitani H. Molecular evolution of the hemagglutinin and neuraminidase genes of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses in Sendai, Japan, during 2009-2011. Virus Genes. 2013 Sep 29. [Epub ahead of print].

4. 金 美賢、神垣 太郎、三村 敬司、押谷 仁. 東日本大震災後の宮城県における避難所感染症サーベイランス. 第60巻 日本公衛誌 第10号、2013年10月. 659-664

2. 学会発表

1. 当広謙太郎. 震災後のインフルエンザウイルスモニタリング. 第60回東北公衆衛生学会. 福島. 2011年7月22日

2. 小田切崇. 抗体価調査からみたモンゴルにおけるインフルエンザ A(H1N1) pdm09 感染. 第65回日本細菌学会東北支部総会. 山形. 2011年8月19日

3. 当広謙太郎、大谷可菜子、岡本道子、神垣太郎、鈴木陽、川村和久、中川洋、押谷仁. 震災後のインフルエンザウイルスモニタリング. 第65回日本細菌学会東北支部総会. 山形. 2011年8月19日

4. 鈴木陽. 震災後のインフルエンザモニタリング. 日本外来小児科学会. 神戸. 2011年8月27日

5. Kentaro Tohma, Akira Suzuki, Taro Kamigaki, Hitoshi Oshitani. Monitoring of influenza viruses in the aftermath of the Great East Japan Earthquake. 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. 和歌山. 2011年11月15日

6. 小田切崇. 仙台ならびにフィリピンで分離されたC型インフルエンザウイルスの遺伝学的解析. 第66回日本細菌学会東北支部総会. 仙台. 2012年8月23日

7. 小田切崇. 遺伝子解析からみた仙台ならびにフィリピンで分離されたC型インフルエンザウイルスの相違. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月14日

8. Takashi Odagiri, Yoko Matsuzaki, Michiko Okamoto, Akira Suzuki, Hidekazu Nishimura, Mariko Saito, Raita Tamaki, Edelwisa Segubre-Mercado, Amado Tandoc, Socorro Lupisan, Seiji Hongo, Hitoshi Oshitani. Isolation of influenza C viruses in the Philippines in 2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. Jan 2013.

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

動物インフルエンザウイルスがパンデミックウイルスに変異する メカニズムの解析

研究分担者 堀本泰介 東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授

研究要旨

インフルエンザパンデミックウイルスは、鳥ウイルスが豚で変異する、あるいは鳥ウイルスとヒトウイルスとの遺伝子交雑により誕生するというメカニズムが考えられている。つまり、予め哺乳動物によるウイルス馴化が必要である。本研究では、豚以外の哺乳動物がパンデミックウイルス誕生の中間宿主となる可能性を考え、野生動物および伴侶動物のインフルエンザウイルスに対する感受性を血清特異抗体の検索により評価した。その結果、国内の野生アライグマが高病原性 H5N1 鳥インフルエンザに、またペット犬や猫が人の季節性ウイルスおよび 2009 パンデミックウイルスに感染した証拠を発見した。さらに、インドネシアの野良猫では H5N1 鳥ウイルスの感染、およびヒトウイルスの感染も検出された。これらの成績は、公衆衛生学的見地から豚以外の哺乳動物に対するサーベイランスの必要性を示すものである。

A. 研究目的

インフルエンザは人や鳥に限らず他の動物にも見られる感染症である。例えば、産業動物である豚や馬のインフルエンザは時に経済的被害を与え、犬や猫の伴侶動物にもウイルスは感染する。また、高病原性 H5N1 鳥ウイルスに感染した野生動物も単発例ではあるが、いくつかの国で見つかっている。本研究では、豚以外の哺乳動物が新たなパンデミックウイルスを作り出す中間宿主になりうるかどうかを検証する一環として、野生動物および伴侶動物の鳥インフルエンザウイルスおよびヒトインフルエンザウイルスに対する感受性を調査することを目的とした。

B. 研究方法

アライグマは、わが国で急速に野生化が進み、野鳥、畜産業、人と頻繁に接触する有害鳥獣であり、最近インフルエンザウイルスに感受性を持つことが米国で報告された (EID 2008)。今回、年々その数を増している国内の野生のアライグマが、高病原性 H5N1 ウイルスに感染している可能性を調査するため、西日本 3 地域、東日本 1 地域で 2005 年以降に捕獲されたアライグマ 988 頭の血清検体 (RDE 処理、非働化)、さらに、2011 年に実際に H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスが侵入した西日本の 1 養鶏場の周辺 (半径 16km 以内) で捕獲した野生のアライグマ 38 頭から採取した血清サンプルについて、各 clade の H5N1 ウイルスを

抗原としたマイクロ中和試験法、WB 法などにより H5N1 抗体を検索した。尚、アライグマ検体の採取には、山口大学共同獣医学部・前田健教授、帯広畜産大学・佐鹿万里子博士、ふるさと自然公園センター・鈴木和男研究員、兵庫県森林動物研究センター・横山真弓博士他の協力を頂いた。

わが国では、ペットの犬にインフルエンザウイルスが感染し問題となったことはない。しかし、海外では高病原性 H5N1 鳥ウイルスが犬に致死感染を引き起こした事例や、ウマ H3N8 ウイルス、鳥 H3N2 ウイルスが犬に伝播し、イヌインフルエンザとして感染拡大した例がある。さらに、2009 パンデミック H1N1 ウイルスが人の感染患者から犬へ伝播した例も報告された。犬に感染したウイルスが馴化し新型ウイルス出現の母体となる可能性も否定できない。本研究では、国内のペット犬にインフルエンザウイルスが感染している可能性を調査するため、2009 年 6 月から 2010 年 7 月の間に、山口大学動物医療センターおよび麻布大学動物病院に各種疾患のため来院した犬から飼い主の許可を得て採取した血清 366 検体を用い、マイクロ中和法によりインフルエンザウイルス抗体を検索した。使用したウイルス抗原は、2009 パンデミック H1N1、季節性 H1N1、季節性 H3N2、鳥 H3N2、イヌ H3N8、および高病原性 H5N1 ウイルス、さらにヒト B 型ウイルスである。

猫の H5N1 高病原性鳥ウイルスの感染例がタイ等で報告されている。感染鳥の捕食が感染源であると推測される。今回、麻布大学動物病院から 26 血清検体を得て、同様にインフルエンザウイルス抗体を検索した。

また、H5N1 高病原性鳥ウイルスがエンデミック状態にあるインドネシア Airlangga

大学の CA Nidom 博士の協力を得て、インドネシアの Jakarta 州 Jakarta、West Java 州 Bandung、Banten 州 Tangerang、East Java 州 Surabaya において野良猫 15 頭を捕獲採血し、血清検体を得た。これらの猫は近くの民家や市場などに自由に出入りする環境下にいた。各 clade の H5N1 鳥ウイルスおよびヒトインフルエンザウイルスを抗原としインフルエンザウイルス特異抗体を検索した。

尚、高病原性 H5N1 ウイルスの取り扱い、その使用が承認されている東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 BSL3 実験室にて実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、野生動物および伴侶動物の血清検体のみを対象にし人血清検体を用いていないため倫理審査には該当しない。伴侶動物の検体に関しては飼い主の研究使用承諾は受けている。

C. 研究結果

アライグマ抗体検査

(1) 3 地域 (西日本 2、東日本 1) の血清 10 検体から H5N1 特異中和抗体を検出した。各 clade の H5N1 ウイルスを用いた抗原交差性試験により、西日本の陽性検体 (2006 年 4、5 月、2007 年 6 月、2008 年 1 月に捕獲) は clade 2.2 ウイルス、東日本の陽性検体 (2008 年 5、7 月捕獲) は clade 2.3.2 ウイルスの感染によることが強く示唆された。

(3) 2011 年の 38 検体中 2 検体から H5N1 特異中和抗体を検出した (陽性率 5.2%)。各 clade の H5N1 ウイルスを用いた抗原交叉性試験により、陽性検体 (それぞれ 2011 年 7、8 月に捕獲、養鶏場からの距離ともに約 11km) はいずれも同時期に日本国内に広く

侵入した clade 2.3.2.1 ウイルスの感染によることが強く示唆された。したがって、養鶏場に侵入したウイルスと同一であると判断できる。

ペット犬抗体調査

(1) パンデミック H1N1 ウイルスに対する中和抗体は 14 検体で陽性であった。このうち 1 頭は季節性 H1N1 ウイルスに対しても同程度の中和活性を示した。季節性 H3N2 ウイルスに対する中和抗体は 8 検体で陽性であった。B 型ウイルスに対する中和抗体は 6 検体で陽性であった。

(2) 鳥 H3N2、イヌ H3N8、および高病原性 H5N1 ウイルスに対する抗体は全ての検体で陰性であった。イヌ H3N8 ウイルスおよびイヌ H3N2 ウイルス（鳥 H3N2 ウイルスに抗原性が近い）は、少なくとも本検査集団には侵淫していない。

ペット猫抗体調査

(1) パンデミック H1N1 ウイルスに対する中和抗体は 1 検体で陽性であった。季節性 H3N2 ウイルスに対する中和抗体は 1 検体で陽性であった。

(2) B 型ウイルスおよび高病原性 H5N1 ウイルスに対する中和抗体は全ての検体で陰性であった。

インドネシア野良猫抗体調査

(1) 猫血清 15 検体中 2 検体から H5N1 特異中和抗体を検出した（陽性率 13.3%）。各 clade の H5N1 ウイルスを用いた抗原交叉性試験により、陽性検体はいずれも clade 2.1.3. のウイルスと強く反応した。中和抗体価はそれぞれ 512 倍と 64 倍であり、その他の clade の H5N1 ウイルスに対しては全てそれ以下の中和抗体価であった。

(2) 別の 1 検体から 2009 H1N1pdm ウイルスに対する中和抗体を検出した（陽性率 6.7%）。

抗体価は 16 倍であった。この検体は弱いながら季節性（ソ連型）H1N1 ウイルスとの反応も見られた（8 倍）。

(3) 季節性 H3N2 ウイルスに対しては全て陰性であった（8 倍以下）。

D. 考察

アライグマ陽性検体がみられた 3 地域のうち 2 地域は、これまでに家禽、野鳥での感染報告はない。西日本の抗体陽性アライグマの捕獲時期から、clade 2.2 ウイルスが宮崎県などで検出される 1 年近く前にはわが国に侵入していたと考えられる。アライグマの食性・行動性から、人知れず感染死した渡り鳥（あるいは留鳥）の捕食により感染した可能性がある。低い陽性検出率から、アライグマ間には H5N1 ウイルスの侵淫はないと考えられる。しかし、2011 年の場合、感染個体がウイルス排出しながら養鶏場に近づいた結果、直接的あるいは間接的な感染源になった可能性はある。養鶏場への感染源になる可能性から、野生動物の侵入防止対策を再確認すべきある。野生動物の調査は、過去のウイルス侵入をモニターできる有効な手段である。

パンデミック H1N1 ウイルスはペットのイヌに感染する。1 頭には呼吸器症状が見られたが関連性は不明である。イヌは季節性 H3N2 ウイルスにも感染する。同様に、ペットの猫にもヒトウイルスの感染が認められた。飼い主からの感染であると推測する。いずれも抗体価が低いことから、軽度な感染で耐過したものと考えられる。

過去に、数例ではあるが猫に H5N1 ウイルスが感染したことがタイなどで報告されている。今回、インドネシアの猫 2 頭に clade 2.1.3. の H5N1 ウイルスが感染していたこ

とが明らかになった。この clade はインドネシアに広く侵淫している H5N1 ウイルスと一致する。興味深いことに、これら抗体陽性猫は市場で捕獲された個体であることから、そこで取引されていた鳥類からの感染が疑われる。少なくとも、インドネシアでは、H5N1 ウイルスに感染した猫が人間と自由に接触できる環境であることは明らかである。一方、ヒトインフルエンザウイルスに感染した猫も 1 頭見つかった。特に、呼吸器症状を示しているという状態ではなく、感染に耐過した個体であると思われるが、その抗体価の低さからウイルスの体内での増殖は決して高くはないものと推測する。

これらの結果から、猫は H5N1 ウイルスにもヒトのウイルスにも感染することは明らかである。したがって、猫の体内で人にパンデミックを引き起こす潜在性を持つ変異ウイルスが生み出される可能性は十分にあると推測する。特に、感染に耐過したことは、逆に感染個体の検出は難しいということを意味しており、感染時のウイルス排出による他の個体へのウイルス伝播の潜在性が高くなる。そういった野良猫が近くの養鶏場への感染源になる可能性は否定できない。また、野良猫が backyard で斃死した鳥を捕食することによりウイルスに感染し、ウイルスを排出しながら養鶏場に近づいた結果、直接的あるいは間接的な感染源になる可能性はある。また、感染した猫が民家に侵入し、居住する人への感染源になる可能性も考えられる。

E. 結論

わが国で野生化したアライグマが H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染

していたことを明らかにした。家庭動物（ペット犬、猫）は季節性ウイルス、新型ウイルスに感染する。これらの成績は、インフルエンザパンデミック対策における野生動物、伴侶動物の公衆衛生学的重要性を発信する

F. 研究発表

1. 論文発表

Horimoto T, Maeda K, Murakami S, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Sashika M, Ito T, Suzuki K, Yokoyama M, Kawaoka Y: Highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 17(4):714-717, 2011.

Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Susuki T, Suzuki Y, Le QM, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivallier P, Chen LM, Donis R, Kawaoka Y: Adaptation of a duck influenza A virus in quail. *J. Virol.* 86(3):1411-1420, 2012.

Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y: A replication-incompetent virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine* 30(42): 6027-6033, 2012.

Tsuda S, Watanabe S, Masangkay JS, Mizutani T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Kato K, Horimoto T, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H: Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. *Arch. Virol.* 157(17):2349-2355, 2012.

Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura K, Shimojima M, Kawaoka Y: Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J. Virol.* 86(3):1405-1410, 2012.

Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T: Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. *Arch. Virol.* 158: 1003-1011, 2013.

Ozawa, M., Shimojima M, Goto H, Watanabe S, Hatta Y, Kiso M, Furuta Y, Horimoto T, Peters NR, Hoffmann MF, Kawaoka Y: A cell-based high-throughput screening system for influenza A viral RNA transcription/replication inhibitors. *Sci. Rep.* 3:1106, 2013.

Horimoto T, Gen F, Murakami S, Iwatsuki-Horimoto K, Kato K, Akashi H, Hisasue M, Sakaguchi M, Kawaoka Y, Maeda K. Serological evidence of infection of dogs with human influenza viruses in Japan. *Vet Rec* in press.

堀本泰介：哺乳動物のインフルエンザ
日本獣医師会雑誌 64(3):177-183, 2011.

堀本泰介：インフルエンザウイルスの病原性
化学療法の領域 27(12): 41-46, 2011.

堀本泰介：インフルエンザワクチン 日生研
だより 57(5):64-69, 2011.

堀本泰介： 2013 年 伴侶動物・野生動物のインフルエンザ
野生動物学 コラム

2. 学会発表

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Sero-prevalence of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan. XVth International Congress of Virology, Sapporo, 2011. Sept.

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、前田健：わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第 154 回日本獣医学会 2012. 9. (盛岡)

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、木曾真紀、村上晋、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、河岡義裕、前田健：わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第 60 回日本ウイルス学会総会 2012. 11. (大阪)

堀本泰介：インフルエンザの歴史 日本獣医史学会 2012. 10. (東京)

前田健、下田宙、米満研三、寺田豊、野口
慧多、高野愛、小寺祐二、竹田努、小野文
子、高井伸二、吉川泰弘、岩附研子、河岡
義裕、堀本泰介：野生イノシシにおけるA
型インフルエンザウイルス感染 第156回
日本獣医学会 2013. 9. (岐阜)

光井英晃、玄文宏、須田遊人、加藤健太郎、
明石博臣、河岡義裕、堀本泰介：A型イン
フルエンザウイルス (H1N1) のHA遺伝子非
コード領域の機能解析 第156回日本獣医
学会 2013. 9. (岐阜)

光井英晃、玄文宏、須田遊人、加藤健太郎、
明石博臣、河岡義裕、堀本泰介：A型イン

フルエンザウイルス (H1N1) のHA遺伝子非
コード領域の機能解析 第61回日本ウイル
ス学会 2013. 11. (神戸)

G. 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

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yasuo Suzuki	Avian and human influenza virus receptors and their distribution.	A.M. Wu (ed.)	The molecular immunology and complex carbohydrates-3 Advances in Experimental Medicine and Biology	Springer-Verlag New York Inc.	New York	2011	443-452

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakauchi, M., Ujike, M., Obuchi, M., Takashita, E., Takayama, I., Ohba, K., Konomi, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T., and the working group for influenza virus surveillance in Japan	Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -sensitive 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay.	J. Med. Virol.	83(7)	1121-1127	2011
Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T.	Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 1 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice.	Vaccine.	29(46)	8330-8337	2011
Featherstone, D. A., Rota, P. A., Icenogle, J., Mulders, M. N., Jee, Y.-M., Ahmed, H., Bispo de Filippis, A. M., Ramamurty, N., Gavrillin, E., Byabamazima, C., Dosseh, A., Xu, W., Komase, K., Tashiro, M., Brown, D., Bellini, W. J., Strebel, P.	Global Progress Toward Measles Eradication and Prevention of Rubella and Congenital Rubella Syndrome.	J Infect Dis.	204(S1)	24-27	2011
Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H.	Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010.	Jpn J Infect Dis.	64(3)	237-241	2011
Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C;	The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response.	Virology,	424(1)	45-55	2011

Nongluk Sriwilajaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Nobuhiro Takemae, Takehiko Saito, Hiroaki Hiramatsu, Koichi Kato, Yasuo Suzuki	N-glycans from porcine trachea and lung: Predominant NeuAc α 2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor.	PLoS ONE	6(2)	e-16302	2011
Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H.	Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response.	PLoS One	6(10)	e26163. Epub 2011 Oct 14.	2011
Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H.	A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase.	Biochem Biophys Res Commun	414(4)	719-26. Epub 2011 Oct 6	2011
Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H.	Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection.	Front Microbiol	2	175	2011
Horimoto T, Maeda K, Murakami S, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Sashika M, Ito T, Suzuki K, Yokoyama M, Kawaoka Y	Highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons, Japan.	Emerg. Infect. Dis.	17(4)	714-717	2011
堀本泰介	インフルエンザウイルスの病原性	化学療法の領域	27(12)	41-46	2011
Ozawa M, Basnet S, Burley LM, Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y.	Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses.	J Virol	85	4596-4601	2011
Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y. Fu, S., Hirayama, N., Ohshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y.	Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies	Jpn. J. Infect. Dis.	65 (1)	19-27	2012
WHO/OIE/FAO F5N1 Evolution Working Group	Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature.	J. Influenza. Other Resp. Virus.	6	1-5	2012
Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies.	Journal of Virological Methods.	180(1-2)	68-74	2012
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	ACS Chem Biol	7(3)	552-562	2012

Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol.	25(1)	1-13	2012
Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A, Kida H.	Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan.	J Gen Virol.	9(3)	541-550	2012
Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Susuki T, Suzuki Y, Le QM, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivaller P, Chen LM, Donis R, Kawaoka Y	Adaptation of a duck influenza A virus in quail.	J. Virol.	86(3)	1411-1420	2012
Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kunihiisa, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro, M.,	Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave	Jpn. J. Infect. Dis.	65	363-367	2012
Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J.S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P.G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G.	Pause on avian flu transmission research.	Science.	335	400-401	2012

Kishida N,Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R,Ikematsu H, Xu H,Takashita E, Tashiro M,Takao S, Yano T,Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K,Saito H,Shimada S, Lin JH, Odagiri TWatanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M,	Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs.	Clin Vaccine Immunol.	19(6)	897-908	2012
K.Ohnishi, Y.Takahashi, N.Kono, N.Nakajima, F.Mizukoshi, S.Misawa, T.Yamamoto, Y.Mitsuki, S.Fu, N.Hirayama, M.Ohshima, M.Ato, T. Kageyama, T.Odagiri, M.Tashiro, K.Kobayashi, S.Itamura, and Y.Tsunetsugu- Yokota.	Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus.	Jpn.J.Infect. Dis.	65(1)	19-27	2012
Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T,Tashiro M,Suzuki Y.	Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition.	Antiviral Res.	94(2)	139-146	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T,Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T,Okuno Y,Odagiri T,Tashiro M, Sata T, Kurata T,Hasegawa H.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Virol.	84(2)	336-344	2012
Asanuma, H., Zamri, N. B., Sekine, S., Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Gilbert, R. S., Fukuiwa, T., Sata, T., Tashiro, M., Fujihashi, K.	A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging.	Vaccine	30	803-812	2012