

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

総合研究報告書

国内における豚インフルエンザ流行動態の解明

研究代表者 小澤 真 鹿児島大学 准教授

国内における豚インフルエンザの流行動態を、血清学的ならびにウイルス学的に解明し、豚インフルエンザウイルス流行株の人への感染リスクや、豚由来ウイルスが海外から侵入した際の養豚を介した国内蔓延リスクを評価する。

A. 研究目的

豚由来のインフルエンザウイルスは、パンデミックを引き起こす可能性があるため、その流行動態を注意深く監視する必要がある。しかし、産業構造などの理由により、国内養豚の血清や鼻腔スワブ検体にアクセスするのは難しく、国内における豚インフルエンザの流行動態はほとんど把握されていない。本研究は、国内における豚インフルエンザの流行動態を、血清学的ならびにウイルス学的に解明することで、豚インフルエンザウイルス流行株の人への感染リスクや、豚由来ウイルスが海外から侵入した際の養豚を介した国内蔓延リスクを評価することを目的とする。

B. 研究方法

【抗体調査】多検体の抗インフルエンザウイルス中和抗体価を効率よく測定するため、遺伝子組換えウイルスを活用して中和試験法を改良した。この改良法を用いて、全国各地から収集する養豚血清検体の中和抗体価を測定し、国内養豚における豚インフルエンザウイルスの浸潤状況を明らかにした。

【ウイルス分離】豚インフルエンザウイルスを効率よく分離するため、様々な豚由来培養細胞株の中から、発育鶏卵よりも感染感受性が良く、ウイルス増殖効率も優れた細胞株を選抜した。この最適化した分離法を用いて、国内の幅広い地域から収集した養豚鼻腔スワブ検体等からのウイルス分離を進めた。

【ウイルス性状解析】分離したウイルス株の遺伝子配列、およびHAタンパク質の抗原性などを解析した。

C. 研究結果

【抗体調査】

中和試験の改良:内部遺伝子の一部にレポーター遺伝子をコードし、そのウイルス粒子表面には、近年国内で分離された4種類（H1亜型2009pdm系統、H1亜型古典的系統、H3亜型北米系統、H3亜型国内系統）の豚インフルエンザウイルス株のHAタンパク質を発現する組換えインフルエンザウイルスをそれぞれ作出した。この組換えウイルスを用いて、従来法よりも感度の高い改良型中和試験を確立した。

血清検体の収集ならびに中和抗体価の測定:全国27道県の179農場から集めた1,598頭分の母豚血清を用いて、改良型中和試験により抗インフルエンザウイルス中和抗体価を測定した。このうち、27道県（100%）の174農場（97.2%）から集めた1,417検体（89.0%）の血清は、試験に用いたいずれかのウイルス抗原に対する中和活性を示し、豚インフルエンザが全国的に蔓延していることが明らかになった。ウイルス抗原別には、H1亜型2009pdm系統株に86.0%、H1亜型古典的系統株に58.1%、H3亜型北米系統株に35.7%、H3亜型国内系統株に18.5%の血清が中和活性を示し、H1亜型2009pdm系統ウイルスが全国の養豚の間で広く流行していることが示唆された。また、H3亜型北米系統ウイルスは中部地方で、前世紀末のヒト季節性H3亜型ウイルスを祖先とするH3亜型国内系統株は九州地方で採材した検体の陽性率および抗体価が高く、各地域で限局的に流行している可能性が示唆された。

【ウイルス分離】

分離法の最適化：ブタ由来の細胞株11種類、インフルエンザ研究で汎用されるイヌ腎臓由来MDCK細胞とその遺伝子改変細胞株2種類、および発育鶏卵をウイルス分離基材候補として、豚インフルエンザウイルスに対する感受性を比較した。このうち、ヒト型受容体（ $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸）を過剰発現したMDCK細胞と発育鶏卵が最も高い感受性を示したが、分離前後のウイルスHA遺伝子の塩基配列を比較した結果、発育鶏卵を用いた分離ウイルスには高頻度で遺伝子変異が確認された。以上の結果から、豚インフルエンザウイルスの分離には、ヒト型受容体過剰発現MDCK細胞が適していることがわかった。

豚インフルエンザウイルス株の分離：全国の養豚農場や家畜保健衛生所、養豚疾病検査会社などから養豚鼻腔スワブや呼吸器組織乳剤など約500検体を収集し、全国5県12農場の養豚から合計20株の豚インフルエンザウイルスを分離した。

【ウイルス性状解析】

HAおよびNA遺伝子分節の解析：上記20分離株のHAおよびNA遺伝子分節の塩基配列を解析し、11株がH1N1亜型、9株がH1N2亜型であることを明らかにした。H1N1亜型分離株のうち9株のHA遺伝子分節・NA遺伝子分節は、ともにH1亜型2009pdm系統に分類され、残りの2株は古典的系統のHA遺伝子分節と2009pdm系統のNA遺伝子分節を併せ持っていた。またH1N2亜型分離株のうち8株は、両遺伝子分節ともに古典的系統だったが、残りの1株は2009pdm系統のHA遺伝子分節と古典的系統のNA遺伝子分節を併せ持っていた。以上の結果から、国内の養豚で流行している豚インフルエンザウイルスには、既知のウイルス系統として確立されたものだけでなく、異なる系統間で生じた遺伝子再集合体も含まれていることが分かった。

内部遺伝子分節の解析：20分離株のうち、同一農場で分離されたHAおよびNA遺伝子分節の塩基配列はほぼ一致したことから、各農場の代表株1株ずつ、およびH1N1亜型とH1N2亜型の両方が分離された1農場に由来する4株、合計15株について、HAおよびNA遺伝子分節以外の6種類の内部遺伝子分節について塩基配列を解析した。その結果、1株のNP遺伝子分節（古典的系統）を除き、解析した残り全ての内部遺伝子分節が2009pdm系統に分類された。以上の結果から、2009pdm系統の内部遺伝子が、従来の国内養豚流行株の内部遺伝子と比べ、養豚集団内において優位な増殖性・伝播性を示すことが示唆された。

HAタンパク質の抗原性解析：HA遺伝子の系統樹解析を行った結果、今回分離したウイルス株のうち10株が有していたH1亜型2009pdm系統のHA遺伝子は、そのほとんどが、現在ヒトで流行しているH1亜型季節性ウイルスの当該遺伝子のクラスターには分類されず、ヒト分離株とは異なる変異・進化を遂

げていることが示唆された。そこで、HAタンパク質の抗原決定領域を構成する56アミノ酸残基について、2009pdm初期分離株を基準として変異の有無を調べたところ、合計25種類のアミノ酸置換が同定され、このうち21変異についてはヒト分離株の中で報告されていないものだった。

遺伝子進化速度の解析：本研究のブタ分離株の2009pdm系統HA遺伝子上にユニークな変異が多数見つかったことから、2009pdm系統ウイルスが、ヒト集団内よりもブタ集団内においてより早く進化している可能性が考えられた。そこで、データベースに登録されている世界中のインフルエンザウイルス遺伝子配列情報の中から、ヒトおよびブタ分離株の2009pdm系統に分類されるNP遺伝子を各々抽出し、2009pdm初期分離株を基準として、NPタンパク質のアミノ酸の経年変異数を調べたところ、ヒト分離株に0.42個/年のアミノ酸変異が見られたのに対し、ブタ分離株では0.65個/年のアミノ酸変異が蓄積していた。以上の結果は、従来から、2009pdm系統ウイルスが、ヒト集団内よりもブタ集団内においてより早く進化していることが示唆された。

D. 考察

本研究で確立した改良型中和試験法により、多くの血清検体の抗インフルエンザウイルス中和抗体価を効率よく測定することが可能になった。本法を用いて全国から採集した母豚血清検体の中和抗体価を測定した結果、H1亜型2009pdm系統のウイルスを中心に、豚インフルエンザが国内の養豚において広く蔓延していることが明らかになった。

各種培養細胞の豚インフルエンザウイルスに対する感受性等を比較・検討した結果、豚インフルエンザウイルスの分離には、ヒト型受容体過剰発現MDCK細胞が適していることがわかった。本培養細胞等を用いて養豚鼻腔スワブ等を検体にウイルス分離を進めた結果、合計20株の豚インフルエンザウイルスを分離した。

各分離株のHAおよびNA遺伝子分節の塩基配列を解析した結果、11株がH1N1亜型、9株がH1N2亜型で、既知のウイルス系統（H1N1亜型2009pdm系統およびH1N2亜型古典的系統）だけでなく、両系統間で生じた遺伝子再集合体も確認された。また各農場の代表株を中心に15株の内部遺伝子分節を解析した結果、その大部分が2009pdm系統に分類されたことから、2009pdm系統の内部遺伝子が、従来の国内養豚流行株の内部遺伝子と比べ、養豚集団内において優位な増殖性・伝播性を示すことが示唆された。

データベースに登録されているヒトおよびブタ分離株の2009pdm系統に分類されるNP遺伝子を対照としてアミノ酸の経年変異数を調べた結果、ブタ分離株の方により多くのアミノ酸変異が蓄積していた。以上の結果は、2009pdm系統ウイルスが、ブタ集団内

においてより早く進化していることが示唆された。

E. 結論

国内養豚において豚インフルエンザウイルスが幅広く浸潤していることが確認された。また、分離株を中心としたウイルス遺伝子の性状解析により、豚インフルエンザウイルス流行株のヒトにおける感染・流行リスクの評価や、季節性インフルエンザワクチンとの抗原交差性、抗ウイルス薬への感受性など、新型インフルエンザ対策を進める上で、有用な知見が提供された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ozawa M, Matsuu A, Yonezawa K, Igarashi M, Okuya K, Kawabata T, Ito K, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. J Clin Microbiol 53, 1331-1338 (2015)

2. 学会発表

第62回日本ウイルス学会学術集会 小澤真、松鶴彩、米澤弘毅、五十嵐学、奥谷公亮、川畑淑子、伊藤公人、小原恭子、種子野章、出口栄三郎 「豚インフルエンザウイルスの効率的なサーベイランス方法の検討」 パシフィコ横浜（横浜市） 2014年11月10日

第159回日本獣医学会学術集会 小澤真、松鶴彩、早川結子、小池郁子、川畑淑子、種子野章、出口栄三郎 「豚インフルエンザウイルス国内分離株の遺伝子解析」 日本大学（藤沢市） 2016年9月7日

平成28年度獣医学術九州地区学会 奥谷公亮、松鶴彩、小澤真 「豚インフルエンザウイルスの遺伝的特性の解明」 千草ホテル（北九州市） 2016年10月16日

第64回日本ウイルス学会学術集会 小澤真、永野希織、川畑淑子、出口栄三郎 「国内養豚における抗豚インフルエンザウイルス抗体の保有状況」 札幌コンベンションセンター（札幌市） 2016年10月24日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。