

令和元年6月11日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21168

研究課題名(和文) ベトナムで流行している鳥インフルエンザウイルスのアヒルに対する病原性の解明

研究課題名(英文) Pathogenicity of Avian Influenza Virus Isolates in Vietnam to domestic ducks

研究代表者

曾田 公輔 (SODA, Kosuke)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：00582983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムの家禽では高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)と低病原性鳥インフルエンザウイルス(LPAIV)が共に蔓延している。本研究では両者が単一個体に重感染した場合にHPAIVの病原性が変化するか検討した。結果、LPAIVが先行しているアヒルに対して、HPAIVの病原性が減弱することが分かった。本現象には両ウイルス間の抗原交差性やLPAIVによる自然免疫の誘導が関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)と並行して低病原性鳥インフルエンザウイルス(LPAIV)が家禽で流行している国が、アジア各国を中心に認められている。本研究により、HPAIVによる症状の顕在化がLPAIVの流行により抑えられ、HPAIVが浸潤している家禽群の同定を困難にしていることが示された。HPAIVの排除には、LPAIVのコントロールも併せて必要であると考えられ、本成果は今後の鳥インフルエンザ対策において有効な手段を講じていく上で強力な科学的根拠となる。

研究成果の概要(英文)：Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) and low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) have been co-circulating in domestic poultry populations in Vietnam. In the present study, we examined whether pathogenicity of HPAIV was affected by co-infection with LPAIV. Upon result, HPAIV showed reduced pathogenicity in domestic ducks with prior infection of LPAIV. Cross-antigenicity between inoculated viruses and/or innate immunity induced by prior LPAIV infection might be involved in the phenomenon.

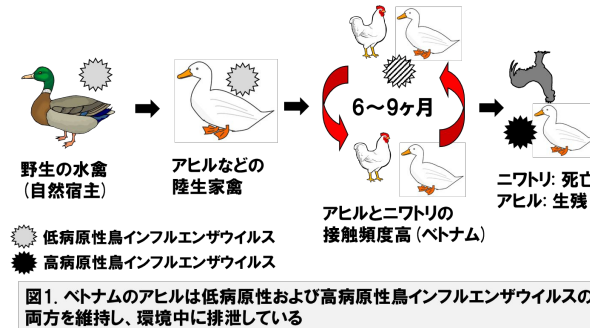
研究分野：獣医感染症学

キーワード：鳥インフルエンザ アヒル 病原性 重感染 ベトナム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスは、表面糖蛋白のヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性によって、それぞれ H1-H16 および N1-N9 の亜型に分類される。全ての HA および NA 亜型のインフルエンザウイルスは、カモなどの野生水禽で受け継がれている。自然宿主である水禽が保有しているウイルスは通常ニワトリに感染しない。しかし、水生家禽と陸生家禽が共存する生鳥市場等で、インフルエンザウイルスはアヒル等を介してニワトリに感染することがある。鶏群内で 6-9 カ月間以上感染を繰り返す間に、ニワトリに対して致死的な病原性を示す高病原性鳥インフルエンザ (HPAI : Highly Pathogenic Avian Influenza) ウイルスが生じることがある (図 1)。



ベトナムではアヒルは食用として多く飼育されている。農場では野外に放し飼いされている場合が多く、野生の水禽と接触しやすい環境下にある。また、これらのアヒルは生きたまま流通し市場で売買されるため、ニワトリなど他の家禽と密接に接触する機会がある。従って、アヒルはベトナムにおいて自然宿主である水禽と飼育されている家禽の間の、中間宿主として機能しやすい環境にあると言える。加えて、アヒルはニワトリと異なり HPAI ウイルスの感染に対して耐過しやすいことが報告されている。よって HPAI ウイルスに感染してすぐに死亡するニワトリと異なり、アヒルは感染後長期にわたって環境中にウイルスを排出し、多くの他の個体にウイルスが伝播する原因となると考えられる。従って、家禽から鳥インフルエンザウイルスを排除し、経済的な被害やヒトへの感染リスクを少なくするために、アヒルにおけるウイルスの浸潤状況の把握とアヒル自体に対する流行ウイルスの増殖性や病原性を理解する必要がある。

研究実施者らは 2011 年 9 月より、ベトナム北部のハノイ、ナムディン省、クアンニン省、中部のニャチャン省、および南部のロンアン省のアヒルを中心にインフルエンザウイルスサーベイランスを継続的に行っている。2014 年 10 月までに、計 2,090 サンプルから 287 株のウイルスが分離された (図 2)。分離率は 13.7% であり、ベトナムのアヒルにウイルスが高率に維持されていることが分かった。分離ウイルスの中には、計 59 株の H5 亜型 HPAI ウイルスが含まれており、ベトナムにおける継続的な HPAI の発生にアヒルのウイルス保有が関与していると考えられる。また一羽のアヒルから複数の亜型のウイルスが同時に分離される例もあった。さらに本サーベイランスにおいて、アヒルから野生の水禽が自然宿主として持っているようなウイルスも分離されている。これらの結果は、ベトナムにおいてアヒルが野生水禽および他の家禽由来のウイルスに感染する機会を有し、流行ウイルスの維持の場となっていることを示している。ウイルスの排除には生鳥市場の閉鎖や感染アヒルの淘汰が有効であると考えられるが、現状ではそのような長年続いてきた家禽の飼養/販売形態を変えるまでには至っておらず、ウイルスはなお家禽の中で存続し続けている。

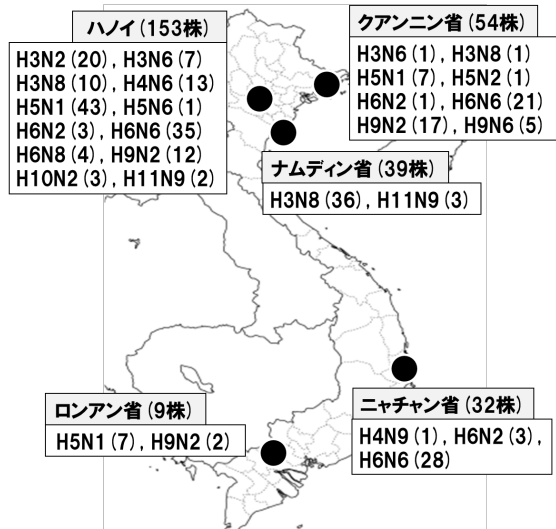


図2. 2011年9月～2014年10月にベトナムのアヒルから分離されたインフルエンザウイルスの亜型 (括弧内の数字は株数を示す)

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスが常にベトナムの家禽で保持されている状況を打破するため、アヒルにおける現在の流行ウイルスの病原性を明らかにし、鳥インフルエンザの防疫に有用な情報を得ることを目的とした。また、アヒルの同一群内で複数の亜型のウイルスが同時に維持されていることから、複数のウイルスに1羽のアヒルが重感染した場合の病態について検証した。

具体的には、ベトナムの家禽から分離された種々の高病原性および低病原性鳥インフルエンザウイルスをアヒルに接種し、臨床症状の有無や生体内におけるウイルス増殖量等を調べた。本結果を基に、重感染モデルに適用するウイルス株を選抜し、一個体に時期をずらして複数のウイルスを接種する重感染実験を実施した。得られた結果を単独のウイルスを接種した場合と比較考察した。

3. 研究の方法

本研究では、(1)ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスのアヒルに対する

病原性、(2)複数亜型のウイルスをアヒルに接種した場合の病態について順に検討した。

(1)では、ベトナムの家禽における鳥インフルエンザサーベイランスで分離された株の中で抗原性および遺伝子解析に基づいて選抜した一連のH5亜型HPAIウイルスおよびH6、H9亜型の低病原性鳥インフルエンザ(LPAI)ウイルスを用いた。各株を1週齢のアヒルに 10^6 50% Egg infectious dose(EID₅₀)鼻腔内接種し、14日間臨床観察を行った。並行して経時的に口腔と総排泄腔の拭い液をサンプリングしウイルス力価を測定した。死亡した個体については主要臓器を採材し、組織中のウイルス価を決定した。

(2)では先行感染させるLPAIウイルスとして、A/muscovy duck/Vietnam/LBM678/2014 (H6N6)またはA/muscovy duck/Vietnam/LBM694/2014 (H9N2)を用いた。各株を1週齢のアヒルに 10^6 EID₅₀鼻腔内接種し、7日後にHPAIウイルスであるA/muscovy duck/LBM808/2015 (H5N6)を同じ力価で追接種した。14日間臨床観察を行うとともに、経時的に口腔及び総排泄腔中のウイルス力価を決定した。生残した個体については、接種ウイルスに対する血清中のHI抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) H6またはH9亜型のLPAIウイルスを接種したアヒルは臨床症状を呈することなく14日間生残した。接種個体からは殆どウイルス排出がなかった一方で、血清中抗体価の陽転が認められ、用いたLPAIウイルスがアヒルに感染することが示された。

1996年末に中国福建省で分離されたH5N1亜型ウイルスの子孫ウイルスが現在もなお世界各国でHPAIを引き起こしている。本ウイルスはHA遺伝子の系統に基づいてclade0-9に分類されており、ベトナムにおいても種々のcladeに属するHPAIウイルスがこれまでに認められている。本研究で用いたHPAIウイルスの中で主に2014年ごろまで流行していたclade1, 2.3.2.1および2.3.4に属するウイルスは、アヒルに極めて高い病原性を示し、接種個体は3日目までに全羽死亡した(図3)。一方で、これらのウイルスに代わって現在主流となっているclade2.3.4.4 HPAIウイルスは、比較的弱い病原性を示し、接種個体が全羽死亡するまで最長で8日を要した。Clade 2.3.4.4ウイルスの中では特に近年分離株を接種した個体が早く死亡し、臓器中のウイルス価が高い傾向が認められた。現在に至るまで本clade2.3.4.4 HPAIウイルスが世界的に主要な流行株であることから、本研究で最も病原性が高いclade2.3.4.4 HPAIウイルスである、A/muscovy duck/Vietnam/LBM808/2015 (H5N6)を以降の重感染実験に適用した。

(2) LPAIウイルスの代わりにリン酸緩衝食塩水(PBS)を接種し、7日後にHPAIウイルスを接種した場合は、アヒルの生残率は25%であった(図4)。一方、H6またはH9亜型LPAIウイルスを先行感染させた場合は50および100%であった。またLPAIウイルスを接種した群では、非接種群と比較し、体外へのHPAIウイルス排出量が有意に低下していた。以上の結果から、LPAIウイルスの先行感染により、HPAIウイルスのアヒルに対する病原性が干渉を受けて減弱することが示され、本プロジェクトの大目的が達成された。HPAIウイルスの病原性が低下した要因として、H6N6亜型LPAIウイルスを先行感染させた場合は、NA亜型(N6)がH5N6 HPAIウイルスと一致していたことにより、液性免疫が働いたことが考えられた。H9N2亜型LPAIウイルスの場合は、先行感染により惹起された自然免疫により、HPAIウイルスの病原性に影響を与えた可能性がある。

本事業終了後もHPAIウイルスの病原性減弱に関与した因子の解明を目指し、その成果を発表していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) Kosuke Soda, Maya Yamane, Hiroshi Ito, Toshihiro Ito. Clade 2.3.4.4 H5 highly pathogenic avian influenza viruses showed various pathogenicity in domestic ducks. The 66th annual meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto 2018年

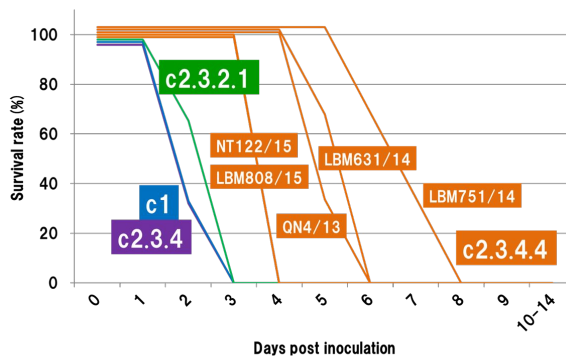


図3. 各HPAIウイルスを1週齢のアヒルに接種した際の生残率

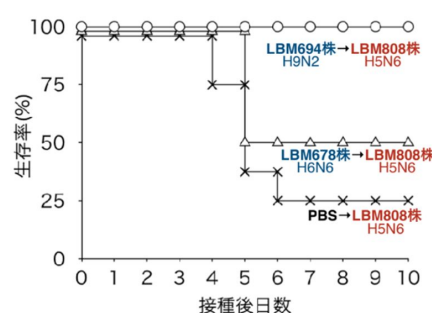


図4. LPAIウイルスおよびHPAIウイルスを重感染させたアヒルの生残率

- (2) 曾田公輔、山根真弥、伊藤啓史、伊藤壽啓、ベトナムの家禽から分離された clade2.3.4.4 H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのアヒルに対する病原性、第 161 回日本獣医学会学術集会、つくば 2018 年
- (3) 永菅麻依子、曾田公輔、仲村 望、Ung Hong Trang、Nguyen Khanh Hang、伊藤啓史、Le Quynh Mai、伊藤壽啓、ベトナムの家禽由来 H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する抗体保有状況、第 161 回日本獣医学会学術集会、つくば 2018 年
- (4) 柏原美奈、曾田公輔、Ung Hong Trang、Nguyen Khanh Hang、伊藤啓史、高桑弘樹、Le Quynh Mai、伊藤壽啓、ベトナムの家禽から分離された H3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析、第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年
- (5) Kosuke Soda, Ung Thi Hong Trang, Nguyen Le Khanh Hang, Tatsufumi Usui, Hiroshi Ito, Hiroichi Ozaki, Tsuyoshi Yamaguchi, Le The Quynh Mai, Toshihiro Ito. Antigenic and genetic analyses of novel clade 2.3.4.4 H5 highly pathogenic avian influenza viruses isolated in Japan and Vietnam. International Union of Microbiological Societies Congresses 2017, Singapore 2017 年
- (6) 柏原美奈、曾田公輔、Ung Hong Trang、Nguyen Khanh Hang、伊藤啓史、高桑弘樹、Le Quynh Mai、伊藤壽啓、ベトナムの家禽から分離された H3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析、第 32 回中国四国ウイルス研究会、倉敷、2017 年
- (7) Nozomi Nakamura, Kosuke Soda, Ung Hong Trang, Nguyen Le Khanh Hang, Hiroshi Ito, Le Thi Quynh Mai, Toshihiro Ito. Serological Surveillance of Highly Pathogenic Avian Influenza in Domestic Poultry in Vietnam. The 64th annual meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo 2016 年
- (8) 仲村 望、曾田公輔、Ung Thi Hong Trang、Le Khanh Hang Nguyen、伊藤啓史、Le The Quynh Mai、伊藤壽啓、ベトナムの家禽の H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) に対する抗体保有状況、第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢 2016 年
- (9) 曾田公輔、Ung Thi Hong Trang、Le Khanh Hang Nguyen、伊藤啓史、Le The Quynh Mai、伊藤壽啓、ベトナムの家禽における H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス流行株の変化、第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢 2016 年
- (10) Kosuke Soda, Ung Thi Hong Trang, Kozue Hotta, Le Thi Quynh Mai, Tetsu Yamashiro, Toshihiro Ito. Antigenic and genetic analyses of novel clade 2.3.4.4 H5 highly pathogenic avian influenza viruses isolated in Japan and Vietnam. Options IX for the Control of Influenza, Chicago, U.S. 2016 年
- (11) Kosuke Soda, Kozue Hotta, Ung Hong Trang, Susumu Toyoumi, Yukiko Uno, Yasuko Nagai, Tatsufumi Usui, Le Quynh Mai, Yukiko Tomioka, Hiroshi Ito, Hiroichi Ozaki, Toshiyuki Murase, Tsuyoshi Yamaguchi, Tetsu Yamashiro, Toshihiro Ito. Antigenic and Genetic analyses of novel clade 2.3.4.4 H5 highly pathogenic avian influenza viruses. The 63rd annual meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka 2015 年
- (12) 曾田公輔、Ung Hong Trang、堀田こずえ、豊海 晋、宇野有紀子、永井泰子、Le Quynh Mai、富岡幸子、尾崎弘一、伊藤啓史、山城 哲、伊藤壽啓、ベトナムのアヒルから新たに分離された clade2.3.4.4 H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性、第 158 回日本獣医学会学術集会、十和田 2015 年
- (13) Kosuke Soda, Kozue Hotta, Ung T. H. Trang, Susumu Toyoumi, Yukiko Uno, Yasuko Nagai, Tatsufumi Usui, Le T.Q. Mai, Hiroichi Ozaki, Hiroshi Ito, Hiroki Takakuwa, Toshiyuki Murase, Tsuyoshi Yamaguchi, Etsuro Ono, Koichi Otsuki, Tetsu Yamashiro, Toshihiro Ito, Antigenic and genetic variation of H5 highly pathogenic avian influenza viruses in domestic ducks in Vietnam, 16th Negative Strand Virus Meeting, Siena, Italy 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。