

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20405043

研究課題名（和文） ベトナムの実験農場における高病原性鳥インフルエンザウイルス侵淫状況調査

研究課題名（英文） Study on prevalence of avian influenza viruses circulating among poultry reared in farms in northern Vietnam

研究代表者

山城 哲 (YAMASHIRO TETSU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00244335

研究成果の概要（和文）：ハノイ近郊農家の家禽、ブタから検体を採取した。平成 20 年度は豚 13.3% (8/60)、アヒル 8.6% (126/1470) から、21 年度は豚 80.9% (242/299)、アヒル 87.8% (527/600)、鶏 55.4% (332/599) から、22 年度は豚 30.7% (92/300)、アヒル 18% (108/599)、鶏 22.7% (136/599) からインフルエンザウイルス A 型遺伝子が検出された。その内 20 年度検体からは H6N1 亜型、H9N2 亜型を分離したものの、H5N1 亜型は分離されなかった。解析の結果、ベトナム株は日本を含む極東地域の株に近く、渡り鳥が伝搬に関与する可能性が示された。15 年～17 年に流行した H5N1 亜型は、現時点では北部ベトナムでは顕著な侵淫は認められない。

研究成果の概要（英文）：A total of 4,526 samples were collected from pigs, ducks and chickens, in winter seasons of 2009-2011, in farms in Hanoi. Of those, influenza A-specific M gene was detected in 52% (342/659) and in 29% (761/2,669), and 39% (468/1,198) the samples taken from pigs, ducks, and, chicken in the seasons, from which H6N1 and H9N2 subtypes of Avian influenza viruses were isolated. Phylogenetic analyses revealed that these two subtypes carried genes close to those isolated in South Korea, as well as in east southern China or in northern Japan, indicating that AIVs circulating among ducks in northern Vietnam were possibly introduced by wild birds migrating along with the East Asian flyway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：(1) ウイルス (2) 感染症 (3) 微生物 (4) 獣医学 (5) 鳥インフルエンザ (6) 家禽

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて大きな損害をもたらす恐れのある新型インフルエンザの出現が危惧され、H5N1 はその候補の一つとされている。その理

由として、2007年7月現在世界中で319のヒト H5N1 感染症が報告され、そのうち192例が死亡している事が挙げられる¹。H5N1 感染症は本来鳥の疾患であり、ヒト H5N1

感染症例発生に先立ち、家禽における流行が見られるのが一般的である。ベトナムにおいても03年12月から05年10月までの間、合計94人のH5N1感染症患者が発生し、そのうち42人が死亡した²。それに先立ちベトナム全土61省で家禽におけるH5N1感染症が発生した。流行制圧の為にベトナム全土における家禽数約3億羽の内、14.8%に相当する約4,450万羽の家禽が殺処分されたとされる³。その後小康を保っていたH5N1感染症は、2007年4月に北部ベトナム18省において家禽におけるH5N1感染症の大規模な発生が報告された⁴。引き続き2007年5月下旬より北部ベトナム5省において7人のH5N1感染患者が発生した。

現在ベトナムハノイ、国立衛生疫学研究所(NIHE)内、フレンドシップ研究室を拠点とし、「ベトナムにおける長崎大学感染症研究プロジェクト(新興・再興感染症臨床疫学研究拠点)」が平成17年度から実施されている。申請者はそのプロジェクトに関わり、平成18年度より5年間ハノイに常駐する。その中で本申請研究における研究分担者、大槻公一を代表とした「インフルエンザウイルスの調査研究」(以下、拠点プログラム研究)が実施されている。研究目的は北部ベトナムにおける家禽群を対象としたH5N1分離および特異抗体調査である。その枠組みで平成18年度、2400羽の外見上健康な家禽から検体を採取し検査・分析を行った。しかしながら現時点ではH5N1の分離は成されていない。その主な原因として、1) 拠点プログラム研究調査手法は毎年1回のみ対象地域でサンプリングを行ういわゆるcross sectionalなものである事、2) 調査の対象となる食肉用家禽はその肥育期間が孵化後60日前後とされ、サンプリングの時期によってはH5N1感染を十分反映するとは言い難い事、3) 調査対象家禽がワクチン既接種であった事が考えられる。

北部ベトナムにおいては、数種類の家畜を同時に飼育するいわゆる混合飼育が伝統的に行われている。典型的にはアヒル、鶏、ブタ、牛などが同一農場で飼育される。新型インフルエンザ出現のシナリオで「遺伝子再集合」によるものが危惧されるが、その中でブタが果たす役割は大きいと推測される。北部ベトナムにおいて家禽と共に混合飼育されるブタがH5N1に感染するかどうかの継続的な監視は重要である。

2. 研究の目的

本研究は北部ベトナムでの家禽(アヒル、鶏)およびブタにおけるH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスH5N1を含む鳥インフルエンザウイルスの浸淫状況を調査する事、および分離した鳥インフルエンザウイルスの遺

伝子における系統樹解析を行い、北部ベトナム地域における同ウイルスの導入背景を考察する。

3. 研究の方法

毎年、ハノイ近郊の農村地域から3か月にわたり、家禽およびブタから検体を採取し、RT-PCR法により、インフルエンザA型ウイルスM遺伝子を検出し、陽性となった検体に関して有精卵を使用したウイルス分離を行う。分離したウイルスについて、ウイルスの亜型決定及び、遺伝子解析を行う。

4. 研究成果

(1) 採取検体数

初年度はブタとアヒル(家鴨)から検体を採取、2年目以降はブタ、アヒル、ニワトリ(鶏)から検体を採取した。採取検体はブタから鼻腔拭い液、家禽から咽喉頭拭い液および糞排泄口拭い液を採取した。

年度	場所	豚	家鴨	鶏
2008	Lien Chau 村, Thanh Oai 区	60	1470	0
2009	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	299	600	599
2010	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	300	599	599

(2) インフルエンザA型ウイルスM遺伝子陽性率

RNA抽出後、RT-PCR法によりインフルエンザA型ウイルスのM遺伝子を検出した。2010年度の遺伝子陽性率は他の年と比べて高い結果となった。

年度	場所	豚	家鴨	鶏
2008	Lien Chau 村, Thanh Oai 区	13.3%	8.6%	-
2009	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	80.9%	87.8%	55.4%
2010	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	30.7%	18%	22.7%

(3) ウイルス分離数

ニワトリの有精卵を使用してウイルス分離を行った結果、初年度はインフルエンザA型ウイルスが22株分離されたが、2010年度は高い遺伝子陽性率にも関わらず、ウイルスは分離されなかった。また、昨年度の検体は輸送準備中である。

年度	場所	豚	家鴨	鶏
2008	Lien Chau 村, Thanh Oai 区	0 株	22 株	-
2009	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	0 株	0 株	0 株
2010	Tan Lap 村, Dan Phuong 区	未*	未*	未*

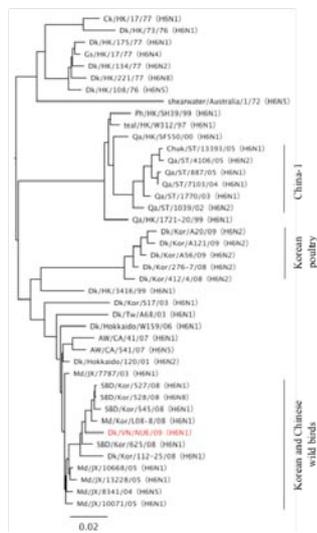
* : 未同定

(4) 分離ウイルス亜型
2009 年度に分離されたウイルス亜型は H6N1 亜型と N9N2 亜型であった。

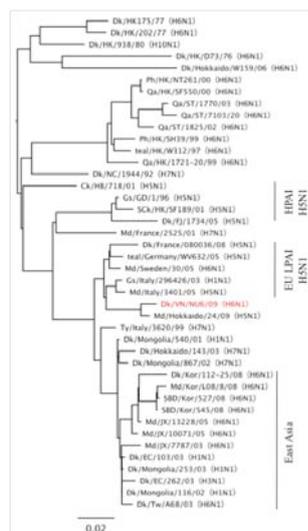
亜型	分離数
H6N1	21 株
H9N2	1 株
H5N1	0 株

(5) 系統樹解析
2009 年度に分離された H6N1 株と H9N2 株の遺伝子系統樹解析である。H6N1 亜型の 21 株はお互いに 9 %以上の相同性であったので、1 株(Dk/VN/NU6/09)だけを系統樹解析に使用した。

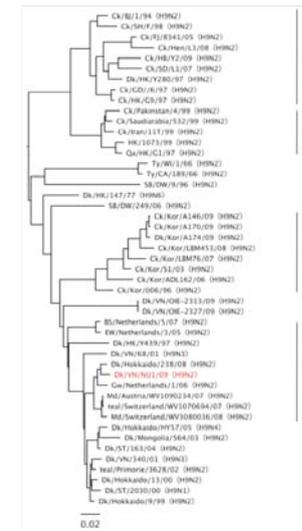
A (HA6)



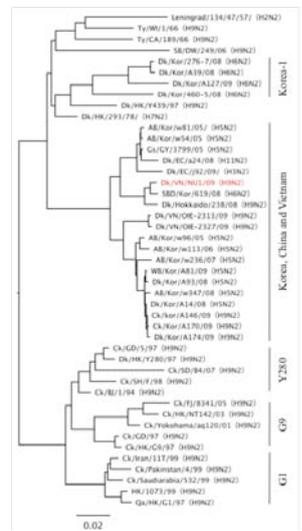
B (NA1)



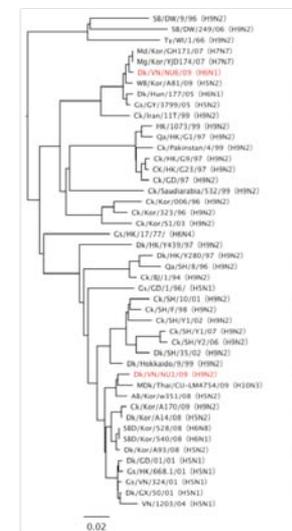
C (HA9)



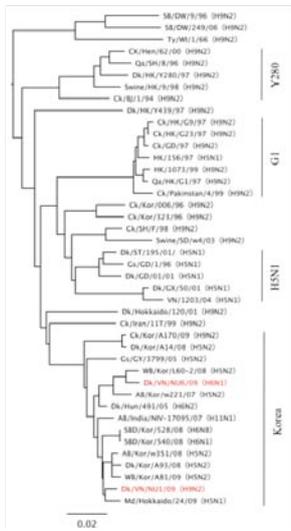
D (NA2)



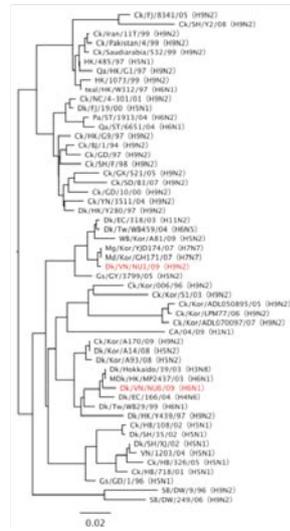
E (PB2)



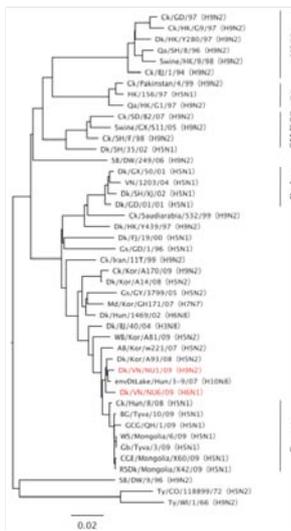
F (PBI)



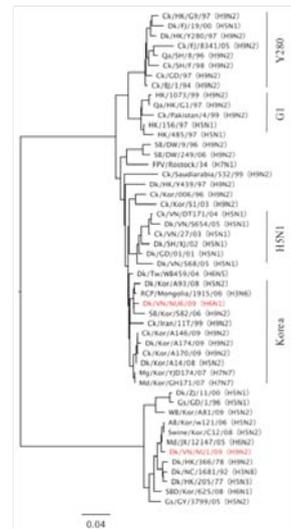
I (M)



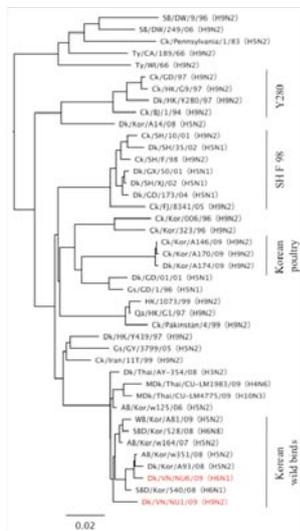
G (PA)



J (NS)



H (NP)



北部ベトナムではかつて家禽において H5N1 の大流行が見られたものの、現在は同亜型の侵淫は家禽においては顕著ではない事が示唆された。一方 H6N1 および H9N2 株が家禽中に流布し、それらウイルスの遺伝子は極東、日本、韓国、中国沿岸部で分離されるインフルエンザ A 型ウイルスと近縁であった。これは渡り鳥のルートと重なっており、渡り鳥によるウイルス伝播が示唆される結果となった。

1997 年香港で発生した高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 出現は H6N1 または H9N2 亜型などの鳥インフルエンザウイルスが関与しているという説がある。同地域は顕著ではないものの H5N1 の侵淫地区である事および H6N1 または H9N2 亜型が家禽中に循環

する事より、潜在的に遺伝子再集合などによる新たな高病原性株出現への監視が必要である事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Takakuwa H., Yamashiro T., Le Q.M., Phuong LS, Ozaki H., Tsunekuni R., Usui T., Ito H., Morimatsu M., Yamaguchi T., Ito T., Murase T., Ono E., Otsuki K. Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry bred in farms in northern Vietnam. Prev Vet Med. In press, 2011.
- ② Shivakoti S, Ito H, Murase T, Ono E, Takakuwa H, Yamashiro T., Otsuki K. Development of reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens. J. Vet. Med. Sci. 72: 513-524, 2010
- ③ Takakuwa H, Yamashiro T., Le MQ, Phuong LS, Ozaki H, Tsunekuni R, Usui T, Ito H, Yamaguchi T, Ito T., Murase T, Ono E, Otsuki K. Possible circulation of H5N1 avian influenza viruses in healthy ducks on farms in northern Vietnam. Microbiol. Immunol. 54、2009、58-62

[学会発表] (計2件)

- ① 堀田こずえ、高桑弘樹、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、山城哲 Isolation and characterization of avian influenza viruses circulating among poultry reared in a village in Hanoi, 2009 Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010 2010年11月11日、ベトナム メリアホテル
- ② 堀田こずえ、高桑弘樹、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、山城哲 ハノイ市郊外で飼育されるアヒルおよびブタより分離されたA型インフルエンザウイルスの遺伝子解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月8日、徳島 あわぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 哲 (YAMASHIRO TETSU)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：00244335

(2) 研究分担者

大槻 公一 (OOTSUKI KOUICHI)
京都産業大学・先端科学技術研究所・教授
研究者番号：00032293

伊藤 壽啓 (ITOU TOSHIHIRO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：00176348