

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870443

研究課題名(和文) H5亜型インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the molecular basis of H5 influenza virus to acquire pathogenicity against chicken

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在に至るまで台湾ではH5N2亜型インフルエンザウイルスによる鳥インフルエンザが断続的に発生し、経済的に大きな被害を与えている。本研究ではなぜ病原性の低いH5N2ウイルスが家禽に対する病原性を獲得するのか検討した。結果、H5N2ウイルスのHAおよびM蛋白質にニワトリに対する病原性の増強に与るアミノ酸を各1か所ずつ認めた。これらのアミノ酸を有しているウイルスは実際に台湾の家禽から近年分離されており、本部位が台湾の家禽における流行ウイルスのニワトリに対する適応に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Until now, highly pathogenic avian influenza caused by H5N2 viruses have occurred in domestic poultry in Taiwan, giving serious economic losses. In the present study, molecular basis of Taiwanese H5 influenza virus to acquire pathogenicity against chicken was examined. The results revealed that two amino acids, which were located in hemagglutinin (HA) and matrix (M) proteins, were involved in viral pathogenicity. The H5 viruses which harbor such amino acids have been actually isolated from domestic poultry in Taiwan, suggesting that these amino acids contributed to the adaptation of epidemic viruses to chickens.

研究分野：獣医学

キーワード：ウイルス インフルエンザ H5亜型 病原性 ニワトリ

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、カモなどの水禽類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において、インフルエンザウイルスはアヒル、ガチョウ、ウズラおよび七面鳥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ウイルスが生じることがある。

上記のように病原性を獲得したインフルエンザウイルスによる高病原性鳥インフルエンザが日本を含む世界各国の家禽で発生し、経済的に大きな被害を及ぼしている。台湾ではH5N2亜型ウイルスによる低病原性および高病原性鳥インフルエンザが断続的に発生し続けており(図1)、病原性の異なるウイルスが家禽の群内で混在していることから、防疫が非常に困難な状況である。

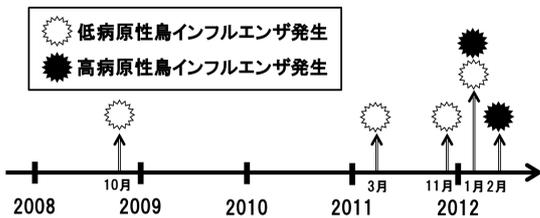


図1. 台湾における鳥インフルエンザの発生状況

2. 研究の目的

研究実施者は2008年10月に台湾で発生した低病原性鳥インフルエンザの原因となったH5N2亜型ウイルス(台湾08株)をニワトリの体内で継代すると、病原性が更新することを2011年に報告した(図2)。これは、例えば流行株の病原性が低い場合であっても、ウイルスが病原性を獲得する可能性を鑑み、発生農場の使用動物の徹底的な摘発淘汰と継続的なサーベイランスが必要であることを強調する報告であった。本メッセージの更なる科学的根拠を得て、台湾の鳥インフルエンザ防疫に資するため、上記報告内で「なぜウイルスが病原性を獲得するに至ったか」を検討した。

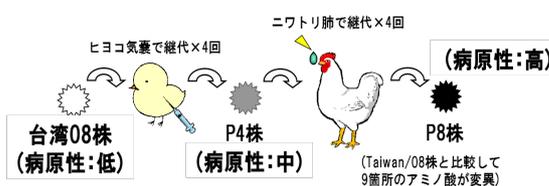


図2. 台湾08株(H5N2亜型)の継代実験

3. 研究の方法

本研究では、  
 (1) 台湾08株のリバースジェネティクス系の確立と変異ウイルスの作出  
 (2) 作出した各変異ウイルスのニワトリにおける病原性の評価とウイルスの病原性獲得に關するアミノ酸の同定を行った。

(1) 「2. 研究の目的」で述べた継代実験においてウイルスに認められたアミノ酸変異がウイルスの病原性獲得にどの程度寄与したかを調べるために、アミノ酸変異を自由に導入できるように、試験管内でのウイルス合成を可能にするリバースジェネティクス系を台湾08株について確立を試みた。

過去に報告したように、台湾08株には継代後に合計8箇所の変異が認められている(図3)。各アミノ酸変異を単独で有するウイルスをSite-directed-mutagenesis法およびリバースジェネティクス法により作出を試みた。

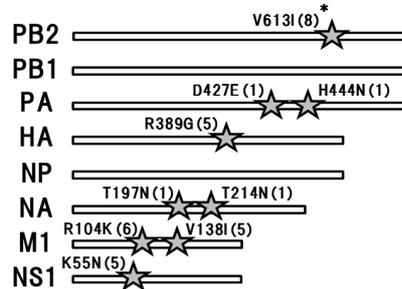


図3. 台湾08株の継代中に認められたウイルス蛋白内のアミノ酸変異

\* 継代前のアミノ酸:アミノ酸番号:継代後のアミノ酸を示す。括弧内数字は変異が初めて認められた際の継代数を示す。

(2) (1)で作出した各変異ウイルスについてニワトリを用いた感染実験により、その病原性を比較/評価した。

4. 研究成果

(1) 台湾08株のリバースジェネティクス系の確立

台湾08株の8本の遺伝子分節をPCR法により増幅し、Tベクターにそれぞれクローニングした。遺伝子配列が台湾08株と同じであることをシーケンスにより確認した後に、発現ベクターであるpHW2000にサブクローニングした。サブクローニングした8本のプラスミドを遺伝子導入試薬と共に293T細胞にトランスフェクションし、上清中の培養液からのウイルス回収を試みた。

結果、台湾08株由来の8本のプラスミドを導入した細胞上清からウイルスを研究期間内に回収することは出来なかった。これらのプラスミド内のいずれかに何らかの問題があったことが考えられる。一方で、表面糖タンパク質であるHAやNAをコードする遺伝子をクローニングしたプラスミドやマトリ

ックス(M)遺伝子をクローニングしたプラスミドは目的のタンパク質を細胞導入により発現することが確認された。従前の報告では継代後の台湾 08 株には HA 蛋白質の 389 番目と M 蛋白質の 104 番目および 138 番目に変異が認められている(図 3)。これらの変異のうち、特に HA の 389 番目および M の 104 番目にアミノ酸置換が起こった後にウイルスの病原性が変化した知見が得られている。そこで、確立した HA プラスミドおよび M プラスミドにそのようなアミノ酸変異を与えるよう site-directed-mutagenesis 法により変異を導入した変異プラスミドを作成した。HA、NA および M 遺伝子は台湾 08 株由来でその他の 5 分節(PB2、PB1、PA、NP および NS)は A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)株由来の変異 H5N2 ウイルスを作成した。作出した株は以下の 3 株である。

- T08HAm1.NA.M/PR8 (H5N2)  
HA 蛋白の 389 番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンに変異したウイルス
- T08HA.NA.Mm1/PR8 (H5N2)  
M1 蛋白の 104 番目のアミノ酸がアルギニンからリジンに変異したウイルス
- T08HAm1.NA.Mm1/PR8 (H5N2)  
および の両変異を有するウイルス

以上 3 株の変異ウイルスのニワトリに対する病原性を感染実験により評価した。

(2) 作出した各変異ウイルスのニワトリにおける病原性の評価

4 週齢ニワトリ、鼻腔内接種試験  
各変異ウイルスを  $10^6$ EID<sub>50</sub>/100ul で 4 週齢ニワトリ各 4 羽に鼻腔内接種し、14 日間臨床観察を行った(表 1)。

表1. 4週齢ニワトリにおける感染実験結果(鼻腔内接種)

	発症鶏	死亡鶏
T08HAm1.NA.M/PR8 (H5N2)	0/4	0/4
T08HA.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	0/4	0/4
T08HAm1.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	1/4	0/4

HA と M 蛋白両者に変異を有するウイルスを接種したニワトリ 4 羽のうち 1 羽が接種後 5-6 日目に沈鬱症状を示した。本個体はその後回復し 14 日間生残した。本実験に供した計 12 羽についてウイルス接種後 14 日目の血清中抗体価を赤血球凝集阻止(HI)試験で測定した結果、全ての個体で接種ウイルスに対する抗体応答が認められた。

8 週齢ニワトリ、静脈内接種試験  
各変異ウイルスを  $10^6$ EID<sub>50</sub>/200ul で 8 週齢ニワトリ各 2-3 羽に静脈内接種し、10 日間臨

床観察を行った(表 2)。

表2. 8週齢ニワトリにおける感染実験結果(静脈内接種)

	発症鶏	死亡鶏
T08HAm1.NA.M/PR8 (H5N2)	0/3	0/3
T08HA.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	0/3	0/3
T08HAm1.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	0/2	0/2

いずれの変異ウイルスを接種した場合においても、ニワトリは全く症状を示さず 10 日間生残した。

#### 4 週齢ニワトリ、静脈内接種試験

各変異ウイルスを  $10^6$ EID<sub>50</sub>/100ul で 4 週齢ニワトリ各 3 羽に静脈内接種し、10 日間臨床観察を行った(表 3)。

表3. 4週齢ニワトリにおける感染実験結果(静脈内接種)

	発症鶏	死亡鶏
T08HAm1.NA.M/PR8 (H5N2)	2/3	0/3
T08HA.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	0/3	0/3
T08HAm1.NA.Mm1/PR8 (H5N2)	3/3	0/3

HA 蛋白のみに変異を有するウイルスを接種したニワトリ 3 羽のうち 2 羽に接種後 3-5 日目に沈鬱症状と肉冠部の軽いチアノーゼが認められた。HA および M 双方に変異を有するウイルスを接種したニワトリは全羽接種後 3-4 日目に発症し、具体的には沈鬱、呼吸器症状、頸部の振戦が認められた。本実験において発症したニワトリはいずれも後に回復し 10 日間生残した。

#### 感染実験結果の評価

過去の研究実施者の報告では、図 3 に示す変異を有する台湾 08 株を鼻腔内接種した 4 週齢ニワトリは全羽発症し 1-2 羽/3 が死亡していた。また 8 週齢ニワトリに静脈内接種した場合、全羽死亡が認められていた。本研究においてその一部の変異を有するウイルスは 4 週齢ニワトリに対して、鼻腔内接種経路において殆ど病原性を示さなかった(表 1)。これは今回導入した変異のみが H5N2 ウイルスがニワトリに対する病原性を獲得する十分条件ではないことを示していると考えられる。また、今回作出したウイルスの遺伝子分節のうち 5 分節は非病原性の A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)株由来であり、この点もウイルスが病原性を発揮しなかった一因である可能性がある。一方で、HA と M に変異を有するウイルスを接種したニワトリは 1 羽ではあるが臨床症状が認められた(表 1)ことが

ら、今回導入した変異は少なからずウイルスのニワトリへの適応に関与しているものと考えられる。この考察はさらに4週齢ニワトリにおける静脈内接種試験結果により補完された。すなわち、HAのみに変異を有するウイルスでは3羽中2羽が発症し、加えてMに変異を有するウイルスはさらに発症率が上昇した(表3)。本結果から、特にH5N2ウイルスの病原性獲得に寄与しているのはHAの389番目のアミノ酸であり、Mの104番目のアミノ酸は補助的に関与しているものと推察された。

これらのアミノ酸を当該部位に有する株は遺伝子データベース検索の結果、実際に台湾の家禽から分離されていることがわかった。すなわち台湾08株のような流行株が台湾の家禽で感染を繰り返すことにより、実験的に見られたアミノ酸変異が野外でも起こり、ウイルスがニワトリに対する病原性を獲得したことが強く示唆された。

本研究では当初の目標であった、台湾08株のリバースジェネティクス系の確立は研究期間内に達成できなかったが、追って確立し今回検討したアミノ酸以外についても検討することでさらにH5N2ウイルスのニワトリへの適応について理解することができるものと考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 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