

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450430

研究課題名(和文) 犬と猫におけるインフルエンザウイルスおよびヘパシウイルス感染状況についての研究

研究課題名(英文) Epidemiological study of influenza virus and hepacivirus among dogs and cats in Japan.

研究代表者

松鷲 彩 (Matsuu, Aya)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：40348595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非霊長類ヘパシウイルス(NPHV)の国内侵入状況を明らかにする目的で、国内の馬および犬の感染状況について調査した。その結果国内の馬における高率な感染を確認したが、一方、犬の感染例は認められなかった。また犬と猫におけるA型インフルエンザウイルス感染状況について明らかにするために、HI試験および中和試験による解析を行ったところ、国内の飼育犬および猫のそれぞれ2.0%および2.1%がヒト季節性インフルエンザウイルスに対する抗体を保有していることを確認した。また犬の0.4%がH3N8亜型馬由来インフルエンザウイルスに対して犬の抗体陽性であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the frequency and distribution of non-primate hepacivirus among horses and dogs in Japan, serum samples from horses and dogs across Japan were screened for anti-nonstructural 3 protein antibodies using the Gaussia luciferase immunoprecipitation system assay. In the result, Japanese horses exhibit a high prevalence of NPHV, while no dogs showed seroprevalence. Serum samples from dogs and cats across Japan were also screened for antibodies against type A influenza viruses isolated from human, horse, and dogs, using hemagglutination inhibition assays and neutralization assays. In the result, 2.0% and 2.1% of the dogs and cats were positive for the subtype H1N1 human seasonal influenza virus, and 0.4% of dogs were positive for the subtype H3N8 virus.

研究分野：獣医内科

キーワード：ウイルス感染症 伴侶動物 非霊長類ヘパシウイルス 犬インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

犬および猫における上部呼吸器感染症は、発熱、発咳、鼻汁などを主徴とし、小動物臨床の現場では一般的に遭遇する疾患の一つである。犬伝染性気管支炎(いわゆるケンネルコフ)は、犬アデノウイルス 2 型、パラインフルエンザウイルスや *Bordetella bronchiseptica* など感染因子の単独あるいは複合によって発生し、猫における伝染性鼻気管炎は主に猫ヘルペスウイルスや猫カリシウイルスが原因となる。近年これらの疾患に類似した症状を示す可能性のある新規ウイルス感染症が世界各地で報告されている。

(1) 非霊長類へパシウイルス(NPHV)

NPHV は、フラビウイルス科へパシウイルス属に分類される RNA ウイルスであり、ヒト C 型肝炎の原因となる C 型肝炎ウイルスのホモログとして初めて北米の 4 か所の動物保護施設で呼吸器症状を示す犬から発見された(1)。このウイルスは、その後の調査により馬に高率に感染していることが確認され(2)、NPHV とヒト C 型肝炎ウイルスとの関連性が注目されている。

NPHV は感染犬の肝臓および呼吸器に分布し、少なくとも急性期には発熱や発咳などの呼吸器症状を呈するものと考えられるが、慢性感染時の宿主に及ぼす影響や、馬および犬の感染状況についての疫学研究は国内では行われていない。

(2) A 型インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスはオルソミクスウイルス科に属する RNA ウイルスであり、A、B および C 型に分類される。A 型インフルエンザウイルスは人、豚、馬、鳥など多くの動物種に感染することが知られており、表面抗原であるヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)の抗原性の違いにより亜型(HA:16 亜型、NA:9 亜型)が分類されている。人由来 H3N2 亜型 A 型インフルエンザウイルスが犬や猫へ散発的に感染することは以前から指摘されている(3, 4)ものの、感染動物は明らかな臨床症状を示さないこと、犬同士あるいは犬から人への伝播は認められないことから重要視されてこなかった。しかし最近世界各地で A 型犬インフルエンザウイルス(CIV)による感染症の発生が報告されている。

北米では 2006 年フロリダ州において競技用犬の犬舎で馬由来 H3N8 亜型 CIV 感染の流行が報告(5)されて以降、多くの州で競技用犬舎、動物保護施設および家庭内飼育犬への感染拡大が認められた。現在はワクチンの普及によって限定的な発生のみが認められる。

一方鳥由来 H3N2 亜型 CIV は 2007 年に中国や韓国の犬舎を中心に流行が確認されたウイルス(6)で、東～東南アジアで流行していたが、2015 年春に北米の犬で流行が始まった。H3N2 亜型 CIV は、犬から猫、猫同士でも感染が成立すること、また感染した場合には犬よ

りも重篤化する傾向にあることも報告されている(7)。

CIV 感染による臨床症状の多くは伝染性気管支炎の症状と類似し、発熱、発咳、頻呼吸などの臨床症状を呈するが、重症例では死に至るケースも報告されている。感染犬は発症後 10 日間程度ウイルスを排泄し、感染犬の 20%は臨床症状を伴わずにウイルスを排泄すると考えられている。

このような近年の世界的な発生状況を鑑みると、国内の犬および猫における A 型インフルエンザウイルス感染状況についても監視が必要であるが詳細な疫学調査は実施されていない。

2. 研究の目的

本研究では、新規呼吸器感染症ウイルスの国内の侵入状況を明らかにすることを目的とし、(1)国内の馬および犬における NPHV 感染状況の調査、(2)国内の犬および猫における A 型インフルエンザウイルスの感染状況の調査を実施した。

3. 研究の方法

(1) 検体採取と保存

犬と猫の検体採取

平成 26 年～28 年の 3 年間にわたり、全国の家畜飼育犬 699 頭と猫 123 頭、国内 2 か所の保護施設で飼育されている犬 116 頭と猫 96 頭の血清検体を収集した。血清はすべて-80 に保存した。

馬の検体採取

平成 26 年 1 月から 8 月の間に全国 11 都道府県で採取した馬 453 頭の血清を収集し、同様に-80 に保存した。

(2) GLIP 法を用いた NPHV 抗体測定系の確立

NPHV 抗体測定法として *Gaussia luciferase immune precipitation system* (GLIPS)法を確立した。HEK293 細胞で発現させた NPHV 由来 NS3 タンパク質とカイアシルシフェラーゼ(*g luc*)の融合蛋白質を作成し、これを抗原として血清と反応後、Protein A/G セファロースに結合した IgG 複合体中のルシフェラーゼ活性を測定した(図 1)。測定法の確立は馬血清を用いて行い、その後国内で飼養されている馬血清を用いて馬における抗体保有状況を明らかにした。続いて同様の方法によって犬血清について測定を実施した。

(3) A 型インフルエンザウイルス抗体価測定

まず GLIPS 法による A 型インフルエンザウイルス抗体価の検出を試みた。*g luc* 融合 A 型インフルエンザウイルス由来 NP 蛋白質および M1 蛋白質を作成し、犬および猫血清における抗体価測定を試みたが、十分な診断精度が得られなかった。

そのため、次の 4 種類の A 型インフルエン

ザウイルスを抗原とした HI 試験を実施し、陽性が認められた検体については中和試験を実施した。

H3N2 亜型ヒト季節性インフルエンザウイルス：A/NewYork/39/2012（国立感染症研究所より譲渡）

H1N1 亜型ヒト季節性インフルエンザウイルス：A/California/7/2009（国立感染症研究所より譲渡）

H3N2 犬インフルエンザウイルス：A/canine/DJ/Korea/2014（韓国忠北大学より譲渡）

H3N8 亜型馬インフルエンザウイルス A/horse/Hokkaido/01/2008（動物衛生研究所より譲渡）

4. 研究成果

(1) 馬および犬における NPHV 感染状況

GLIP 法によって、国内で飼養されている 453 頭の馬のうち 152 頭 (33.6%) が抗体陽性であることを確認 (図 1) し、日本の馬が高率に感染していることを確認した。統計学的解析によって若齢時に感染が成立し、その後一部の馬で持続感染となる可能性が示された。馬における NPHV 感染は主に肝臓におけるウイルス増殖が報告されていることから、今回すべての馬の肝機能関連生化学検査を実施したが、感染馬に有意な異常は認められなかった(8)。馬において NPHV は不顕性感染となる可能性が疑われたが、併発疾患や老齢の馬などにおける病態についても今後の詳細な解析が必要である。

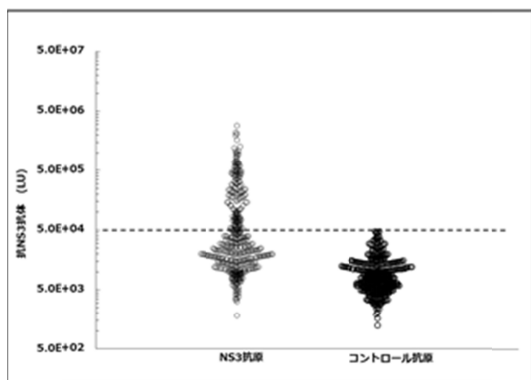


図 1. GLIP 法による馬 NPHV NS3 抗体価測定。破線はカットオフ値を示す。

一方、犬における NPHV 抗体陽性個体は確認されなかった。NPAHV は 2010 年に北米で呼吸器症状を呈した犬から初めて同定されたが、その後海外における疫学調査では馬以外の感染動物は見つかっていない。日本国内でも馬における高率な感染が確認されたことから国内への侵入が明らかとなったが、犬における感染は認められなかった。本ウイルスの自然宿主は馬に限定的であると推測される。

(2) 犬と猫の A 型インフルエンザウイルス感染状況

上記 NPHV の抗体価測定に用いた GLIP 法は、他の免疫反応と比較すると非特異反応が少なく、また動物種を選ばないという利点がある。このことから、本研究では A 型インフルエンザウイルスに対する抗体価測定を GLIP 法による検出を試みたが、十分な精度が得られなかった。おそらく哺乳動物細胞における発現蛋白の構造の変化などが原因として疑われた。

そのため HI 試験および中和試験を実施し、ヒト季節性インフルエンザウイルスと、現在犬で感染の流行が確認されている馬由来 H3N8 亜型ウイルスと犬由来 H3N2 亜型ウイルスを用いて、スクリーニングを実施した。その結果、犬の 2.0% および猫の 2.4% で H1N1 亜型ヒト季節性インフルエンザウイルスに対する陽性例を確認した。H3N2 亜型ヒト季節性インフルエンザウイルスに対して 0.5% の犬が陽性を示し、猫で陽性例は認められなかった。また犬の 0.4% で H3N8 亜型馬インフルエンザウイルスに対する抗体陽性例を確認した。H3N2 亜型犬インフルエンザウイルスに対して陽性となる個体は認められなかった (表 1)。

表 1. 犬および猫における A 型インフルエンザウイルスに対する抗体保有率

犬	検査数	ヒト季節性インフルエンザウイルス		犬由来	馬由来
		H1N1	H3N2	H3N2	H3N8
犬	815	16 (2.0%)	4 (0.5%)	0 (0%)	3 (0.4%)
猫	141	3 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

国内において犬の A 型インフルエンザウイルス感染状況を調査した研究はわずかしかなく、猫については研究代表者が知る限り報告されていない。本研究では犬および猫におけるヒト季節性インフルエンザウイルスに対する抗体陽性がわずかに存在することを明らかにした。猫では H1N1 亜型季節性インフルエンザウイルスに対して感受性であり、飼主の発症後に飼育猫が発症した報告もあることから(9)、猫の場合には飼主のインフルエンザ感染時には注意が必要であると思われる。H3N2 亜型 CIV に対する抗体陽性例は認められなかったが、3 頭の犬において H3N8 亜型馬インフルエンザウイルスに対する抗体陽性を確認した。陽性個体のうち 2 頭が鹿児島県内の動物管理事務所保護された犬であったことから、追加研究としてこの施設で 50 例の犬のスワブ検体を採取したが、A 型インフルエンザウイルスは分離されなかった。抗体陽性を示した犬が、北米で流行している H3N8 亜型 CIV に感染したのか、あるいは馬インフルエンザウイルスに近縁な何らかのウイルスへの曝露歴があるのかについては不明である。いずれにしても、国内の犬において二種類の CIV に対する抗体陽性例はわずかであることから、現時点で流行が発生した可能性は考えにくく、万が一国内に侵入した場合には流行が拡大する恐れがある

可能性が示された。

引用文献

- (1) Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM, Shields S, Lipkin WI. 2011. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A 108:11608-11613.
- (2) Scheel TK, Simmonds P, Kapoor A. 2015. Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. Antiviral Res 115:83-93.
- (3) Sponseller BA, Strait E, Jergens A, Trujillo J, Harmon K, Koster L, Jenkins-Moore M, Killian M, Swenson S, Bender H, Waller K, Miles K, Pearce T, Yoon KJ, Nara P. 2010. Influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus infection in domestic cat. Emerg Infect Dis 16:534-537.
- (4) Sun Y, Shen Y, Zhang X, Wang Q, Liu L, Han X, Jiang B, Wang R, Sun H, Pu J, Lin D, Xia Z, Liu J. 2014. A serological survey of canine H3N2, pandemic H1N1/09 and human seasonal H3N2 influenza viruses in dogs in China. Vet Microbiol 168:193-196.
- (5) Yoon KJ, Cooper VL, Schwartz KJ, Harmon KM, Kim WI, Janke BH, Strohhenn J, Butts D, Troutman J. 2005. Influenza virus infection in racing greyhounds. Emerg Infect Dis 11:1974-1976.
- (6) Song D, Kang B, Lee C, Jung K, Ha G, Kang D, Park S, Park B, Oh J. 2008. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. Emerg Infect Dis 14:741-746.
- (7) Song DS, An DJ, Moon HJ, Yeom MJ, Jeong HY, Jeong WS, Park SJ, Kim HK, Han SY, Oh JS, Park BK, Kim JK, Poo H, Webster RG, Jung K, Kang BK. 2011. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010. J Gen Virol 92:2350-2355.
- (8) Matsuu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y, Amaya T, Osaki T, Horie M, Masatani T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. 2015. Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. Vet Microbiol 179:219-227.
- (9) Pigott AM, Haak CE, Breshears MA, Linklater AK. 2014. Acute bronchointerstitial pneumonia in two indoor cats exposed to the H1N1 influenza virus. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 24:715-723.

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1件)

Matsuu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y, Amaya T, Osaki T, Horie M, Masatani T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. Vet Microbiol. 査読有 30;179(3-4):219-27. 2015.

[学会発表](計4件)

松鷺 彩 古い感染症と新しい感染症
第13回日本獣医内科学アカデミー、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2017年2月18日

松鷺 彩、遠藤泰之、桃井康行、安藤匡子、馬場 希、小林行治、井口愛子、日笠喜郎
「犬および猫におけるA型インフルエンザウイルス感染状況についての血清学的調査」
小動物獣医師九州大会、千草ホテル(福岡県・北九州市) 2016年10月16日

松鷺 彩「知っておきたいちょっと変わった感染症：犬インフルエンザ」
第12回日本獣医内科学アカデミー、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016年2月20日

松鷺 彩、帆保誠二、小澤 真、堀江真行、正谷達膳、實方 剛、佐藤文夫、遠藤祥郎、天谷友彦、小原恭子「全国の馬における非霊長類由来へパシウイルスの感染状況」
第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道・札幌市) 2014年9月10日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

松鷺 彩 犬と猫のインフルエンザ(解説)
J-VET 29(1):38-42 2016年1月

松鷺 彩 犬インフルエンザ(解説)
Journal of Small Animal Medicine 18(1):40-41. 2016年1月

6. 研究組織

(1)研究代表者

松鷺 彩(MATSUU, Aya)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：40348595

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
桃井 康行 (MOMOI, Yasuyuki)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号：40303515