

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580375

研究課題名（和文） ベトナムの市場で販売される家鴨卵中の抗高病原性鳥インフルエンザウイルス抗体調査

研究課題名（英文） Research for antibody against high pathogenic avian influenza virus in duck yolk from market in Vietnam

研究代表者

堀田 こそえ (HOTTA KOZUE)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：70466192

研究成果の概要（和文）：本研究は、北部ベトナムの市場で売られているアヒル卵が保有する移行抗体から、親鳥における鳥インフルエンザウイルスに対する抗体保有率を明らかにする。2010年4月から2012年3月までの2年間、毎月、ハノイ市内、10カ所の市場から各10個のアヒル卵を入手し、H4, H5, H6, H7, H9, H11 亜型ウイルスに対する抗体を調べた。その結果、抗体陽性率は抗 H4(0.8%)、抗 H5(44.1%)、抗 H6(11.5%)、抗 H7(0%)、抗 H9(1.2%)、抗 H11(2.1%)を示した。これらの結果から、卵を用いて簡易にアヒルにおける鳥インフルエンザウイルスの流行状況を知ることができた。

研究成果の概要（英文）：This is the research for the prevalence of antibody against avian influenza virus using duck eggs in the market, northern Vietnam. We collected 10 duck eggs each from 10 markets in Hanoi, from April 2010 to March 2012, and the samples were tested for the antibody against H4, H5, H6, H7, H9 and H11 subtype viruses. Anti-H4, H5, H6, H7, H9 and H11 HA antibodies were detected 0.8%, 44.1%, 11.5%, 0%, 1.2%, and 2.1%, respectively. These results suggested that the prevalence of avian influenza virus among ducks was revealed by HI test using eggs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

ベトナムでは 2003 年から研究開始当初の 2009 年までに 106 人が H5N1 ウイルスに感染、そのうち 52 人が発症し死亡していた。

ベトナムにおいて、H5N1 ウイルス感染経路は明らかになっていないが、水鳥であるアヒルは H5N1 ウイルスに感染した野鳥と水辺で接触し、ウイルスを伝播される可能性が高い。また、H5N1 ウイルスに対して高感受性のニワトリと異なり、6 週齢以上のアヒルは H5N1 ウイルス抵抗性で不顕性感染を起こす。これまでに、鳥インフルエンザウイルスが肉や卵などの食品を通じてヒトに感染したという事実は確認されていないが、H5N1 ウイルス流行地において、不顕性感染を起こしているアヒルが産んだ卵表面へのウイルス付着の可能性は否定できない。日常的に食卓に上るアヒル卵を監視することと、アヒル卵の保有する移行抗体から親鳥の H5N1 自然感染状況を把握することは重要であった。

2. 研究の目的

本研究は北部ベトナムの市場で売られているアヒル卵が保有する移行抗体から、親鳥における H5N1 ウイルスの自然感染状況を把握し、食の安全に関する調査を目的とする。

(1) 北部ベトナムの市場で売られているアヒル卵の抗 H5 特異赤血球凝集抑制 (HI) 抗体保有状況を明らかにする。

(2) H5 亜型以外で、ベトナムと近隣諸国の家禽から分離されている亜型 (H4, H6, H7, H9, H11) についても HI 試験を行う。

以上のことから、ワクチン接種および自然感染に因る親鳥の抗 H5 抗体保有率が明らかになる。また、親鳥の他亜型鳥インフルエンザウイルス自然感染率がわかる。

上記を 3 年間行うことで、アヒル卵が保有する移行抗体から、親鳥における鳥インフルエンザウイルス自然感染状況の趨勢を監視する。

3. 研究の方法

(1) 2010 年 4 月から 2012 年 3 月までの 2 年間、毎月、ハノイ市内の市場 (10 市場) からアヒル卵 (1 市場 10 個)、計 100 個を入手し、卵黄からタンパク質と脂質を取り除き漿尿液を精製する (IgY 精製)。

(2) 検体は RDE 処理を行い、検体中に含まれる非特異的赤血球凝集抑制物質の作用を取り除く。

(3) 赤血球凝集抑制試験 (HI 試験) を行う。用いる抗原は H4, H5, H6, H7, H9, H11 亜型である。

<HI 試験とは>

インフルエンザウイルスは動物の赤血球を凝集する性質がある。RDE 処理済みの検体を

希釈し、一定の抗原量のウイルスを加えて反応させる。そこへ、ニワトリ赤血球浮遊液を加え、どの希釈まで凝集が抑制されているかを観察する。このとき、赤血球凝集が完全に抑制された最終希釈倍率を HI 抗体価とする。これにより、検体中に抗インフルエンザウイルス抗体がどのくらい含まれているかを調べる。

(4) ベトナムの市場では農場から運ばれた状態で卵が販売されており、洗浄されていない。そこで、卵の外側を綿棒で拭き、RT-PCR 法により、A 型インフルエンザウイルスの遺伝子検出を行い、陽性検体については HA 亜型の RCR も行った。検体は同じ市場で購入した卵を 5 個 1 検体として、試験を行った。

4. 研究成果

(1) 2010 年 4 月から 2012 年 3 月までの間にハノイの市場で集めたアヒル卵の総数は 2,398 個であった。これらの卵に含まれる移行抗体は、抗 H4 亜型ウイルスに対する陽性数が 20 (0.8%) 検体、抗 H5、1,057 (44.1%) 検体、抗 H6 が 275 (11.5%) 検体、抗 H7 が 0 検体、抗 H9 が 29 (1.2%) 検体、抗 H11 が 51 (2.1%) 検体であった。ベトナムでは H7 亜型ウイルスの報告は無く、今回の結果からも H7 亜型ウイルスはベトナムにおいて発生している可能性が低いことがわかった。

図 1 検体総数と HI 試験陽性数

検体数	HI 試験抗原亜型					
	H4	H5	H6	H7	H9	H11
陽性数	20	1057	275	0	29	51
陰性数	2378	1341	2123	2398	2369	2347
合計	2398	2398	2398	2398	2398	2398

(2) 北部ベトナムでは毎年 7 月頃と 11 月頃の年 2 回、家禽へのワクチン接種 (抗原は H5N1 clade 2.3.4) を義務づけていたが、ウイルスの抗原変異 (新しいウイルス H5N1 clade 2.3.2.1) により、従来のワクチン接種は 2011 年 7 月に一時停止し、新しいワクチンの生産を待っている状況である。

図 2 はアヒル卵が保有する H5 亜型ウイルスに対する移行抗体を月ごとに示したもので、ベトナムのワクチン接種時期を反映しておらず、11% から 78% の間を数ヶ月ごとに上下している。これは、ワクチン接種による抗 H5 亜型抗体のほかに H5 亜型ウイルスの流行に因る抗体の上昇も含まれていると考えられる。そして、北部ベトナムでのワクチン接種は 2010 年 11 月の接種以降、一時停止であることから、2011 年からの抗 H5 亜型ウイルス

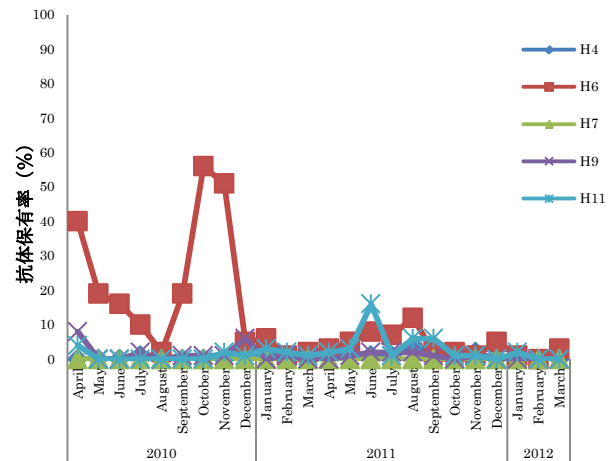
抗体の高い値は H5 亜型ウイルスの流行および常在している可能性を示している。しかしながら、H5 ウイルスの自然感染による抗体とワクチン接種による抗体を区別することは難しいのが現状である。

図 2 抗 H5 抗体保有率



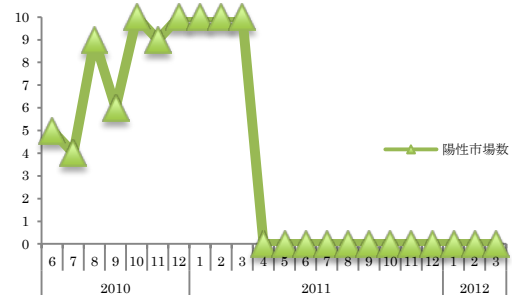
(3) 図 3 はアヒル卵が保有する抗 H4, H6, H7, H9, H11 亜型抗体保有率を示したものである。H5 亜型ウイルス以外はワクチン接種を行っていないため、抗体の保有率はそのウイルス亜型の発生を示唆する。抗 H6 亜型抗体保有率は 2010 年 4 月と 10 月に 40% と 55% となっており、この頃に H6 亜型ウイルスの大きな流行があったと思われる。また、この 2 回の流行の他、2011 年 6 月から 8 月と 12 月にも小さい流行があった可能性がある。抗 H9 亜型ウイルスの抗体は 2010 年 4 月と 12 月に検出されているがどちらも 10% 以下の低い値であった。抗 H11 亜型抗体は 2011 年 6 月に 16% となっており、この頃に小さい流行があったと考えられる。抗 H7 亜型ウイルス抗体以外の抗体は低い値でも半数以上の月で検出されており、北部ベトナムには H4, H6, H9, H11 亜型ウイルスが常在している可能性が高いことが示唆された。

図 3 抗 H4, H6, H7, H9, H11 抗体保有率



(4) 2010 年 6 月から、卵殻外の A 型インフルエンザウイルス検出を RT-PCR 法にて行った。その結果、卵殻外からの A 型インフルエンザウイルスの遺伝子は 2011 年 3 月まで検出されたが、それ以降は検出されなかった (図 4)。これらの陽性検体は HA 亜型 RT-PCR も行った。2010 年 12 月までに亜型が決定できた検体は全て H6 亜型となり、この結果は HI 試験による抗体保有率から予想される、2010 年に H6 亜型が大流行したことを更に裏付ける結果となった。2011 年 1 月から 3 月は全ての市場からインフルエンザウイルス遺伝子が検出されたが、HA 亜型は決定できなかった。また、2011 年 4 月以降に遺伝子が検出されなかったのは、弱毒型ウイルスの大きな流行がなかったことが理由と考えられるが、市場の衛生環境が向上されたことも理由の一つとなる可能性がある。

図 4 A 型インフルエンザウイルス遺伝子検出市場数



(5) 以上の結果から、アヒル卵を用いた移行抗体調査を行うことで、A 型インフルエンザウイルスの流行調査を簡易に行えることがわかった。また、H5 亜型ウイルスは北部ベトナムに常在している可能性が高いことが明らかになった。

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1件)

Kozue Hotta, Hiroki Takakuwa, Le Thi Quynh Mai, Song Phuong Lien, Toshiyuki Murase, Etsuro Ono, Toshihiro Ito, Koichi Otsuki, Tetsu Yamashiro. Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. Virus Research, 査読有 163:448-453, 2012

[学会発表] (計2件)

① 堀田こずえ、北部ベトナムのアヒルから分離されたH6N1 亜型ウイルスの病原性解析、第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月11-16日、北海道、札幌コンベンションホール

② 堀田こずえ、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、徳島県、あわぎんホール

[その他]

ホームページ等

長崎大学熱帯医学研究所 ベトナム拠点

URL: <http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/vietnam/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 こずえ (HOTTA KOZUE)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：70466192

(2) 研究分担者

山城 哲 (YAMASIRO TETSU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00244335

伊藤 壽啓 (ITO TOSHIHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00176348

村瀬 敏之 (MURASE TOSHIYUKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20229983

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：