

令和元年6月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07704

研究課題名(和文) 家禽におけるトリインフルエンザの感染防止に向けたスクリーニング

研究課題名(英文) Screening on the distribution of receptors for avian influenza virus in the chicken and quail

研究代表者

大森 保成 (Ohmori, Yasushige)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60152261

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)：トリとヒトのインフルエンザウイルスは細胞膜上に存在する異なる糖鎖に結合することで感染すると言われている。レクチン染色により鳥類バイオサイエンス研究センターで保有しているニワトリとウズラ、および畜舎周辺に生息する野生動物において受容体の量を調べた。

トリインフルエンザウイルス受容体はニワトリ22系統の中でOSとプチッココで、ウズラ20系統ではNIES-L系統で最も少かった。レクチン染色により受容体の量を判別できるので、トリインフルエンザに感染しにくい系統の育種が可能である。野生動物では、スズメ、ヒヨドリ、キジバト、アカネズミがトリインフルエンザウイルスを畜舎内に持ち込む可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養鶏養鴨場で高病原性トリインフルエンザウイルスの感染が見つかり、流行の拡大を防止するために飼養しているニワトリやウズラの殺処分や周辺の農場でも卵や肉の移動禁止などの処置がとられ、家禽産業がこうむる損失は計り知れない。高病原性トリインフルエンザは家禽産業にとって非常に脅威となっている。本研究の結果からトリインフルエンザウイルス受容体の量には系統差があることが分かったので、受容体が少ない系統をもとにして育種することによって、トリインフルエンザに感染しにくい系統を作出できることが示された。

研究成果の概要(英文)： The distribution of two influenza virus receptors, SA 2-3Gal (avian) and SA 2-6Gal (human), was studied. I prepared 22 chicken and 20 quail strains maintained in the Avian Bioscience Research Center of Nagoya University. The paraffin tissue sections were stained with MAM and SSA lectins which bind to SA 2-3Gal and SA 2-6Gal, respectively.

The results of MAM and SSA lectin staining showed that cilia of epithelial cells, goblet cells and mucus gland cells in respiratory organs were positive. In the intestinal tracts, the result of lectin staining showed that striated border of absorptive epithelial cells and goblet cells were positive. Receptors for avian influenza were the least in OS and Petit-Cocco strains of the chicken and NIES-L strain of the quail. In terms of distribution for receptor, it may be concluded that these chicken and quail strains are most insusceptible to avian influenza.

研究分野：動物形態学

キーワード：トリインフルエンザ 感染防止 ニワトリ ウズラ 系統差 野生動物 スクリーニング

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

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な規模で高病原性トリインフルエンザが流行し、東南アジアや中国を中心に家禽から人への感染が続発して死者も出ている。養鶏養鴨場でトリインフルエンザウイルスの感染が見つかり、流行の拡大を防止するために飼養しているニワトリやウズラの殺処分や周辺の農場でも卵や肉の移動禁止などの処置がとられ、家禽産業がこうむる損失は計り知れない。さらに、トリインフルエンザウイルスが抗原性を大きく変化させ、人から人へ次々と感染してスペイン風邪をしのぐ新たな世界的大流行(パンデミック)に発展する危険性が危惧されている。このような状況下で、2010年から2011年には全国で9県24農場において高病原性トリインフルエンザの発生が確認され、約183万羽が防疫のために殺処分された。2014年にも熊本県の1農場で高病原性トリインフルエンザの発生が確認され、約11万羽が殺処分された。このように家禽産業は常にトリインフルエンザの危険性にさらされている。

2. 研究の目的

トリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体は細胞表面にある糖鎖型の違いにより識別できるので、ニワトリとウズラ、各種野生動物の呼吸器と腸管の粘膜上皮細胞が持っている糖鎖型を解明し、次の点を明らかにする。

1. 鳥類バイオサイエンス研究センターで維持しているニワトリ22系統とウズラ20系統の腸管と呼吸器においてトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の局在性を明らかにし、トリインフルエンザウイルスに抵抗性を持つ系統を見いだす。

2. スズメ、カラス、ハトなどの野生鳥類や畜舎内のネズミを捕獲して腸管と呼吸器におけるトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の局在性を明らかにし、野生動物からニワトリやウズラにトリインフルエンザウイルスが伝播する可能性を解明する。

3. ニワトリとウズラにおいて、組織標本を作製しなくても気管粘膜や直腸粘膜からインフルエンザウイルス受容体の存在を検出できるような簡易スクリーニング法を確立する。

3. 研究の方法

1. 家禽の腸管と呼吸器におけるトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の局在性

トリ型インフルエンザウイルスは粘膜上皮細胞の膜表面にあるシアル酸 α 2-3ガラクトースに、ヒト型インフルエンザウイルスはシアル酸 α 2-6ガラクトースに特異的に結合する。レクチンは特定の糖鎖に結合するので、トリ型のウイルス受容体はイヌエンジュレクチン(MAM)で、ヒト型のウイルス受容体はニホンニワトコレクチン(SSA)で検出できる。材料として鳥類バイオサイエンス研究センターで維持しているニワトリとウズラの各系統を用い、灌流固定をしてから腸管と呼吸器を採取、パラフィン切片を作製する。方法はビオチン化MAMとビオチン化SSAを用い、脱パラフィンした切片にビオチン化レクチン溶液を滴下して4℃で一晩インキュベートし、次に緩衝液で洗浄後にHRP標識アビジンビオチン複合体溶液で室温4時間インキュベートする。緩衝液で洗浄後にジアミノベンジジン反応を行って可視化する。通常の免疫組織化学法と同様に、レクチンの結合した部位はベンジジン反応により茶褐色に染色されるので、トリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の存在部位を光学顕微鏡下で確認できる。呼吸器と腸管の粘膜上皮細胞がMAMとSSAで染色されるかどうか、染色性の強さに呼吸器系と消化器系の各部位により差異があるかどうかを解明する。

2. 野生動物におけるトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の局在性

愛知県の許可を得て畜舎の周囲に生息し、ウイルスを畜舎内に持ち込む可能性のあるスズメ、カラス、ハトなどの野生鳥類やネズミ類などを捕獲し、上記実験と同様にしてトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の存在部位を解明する。トリインフルエンザウイルスの受容体を持っている動物は畜舎内へインフルエンザウイルスを持ち込む可能性が高いと判断される。

3. インフルエンザウイルス受容体の簡易スクリーニング法の確立

ニワトリやウズラを灌流固定し、パラフィン切片を作製してからレクチンの染色性を調べる方法では時間も手数もかかるし、その個体を交配実験に使用することができないので、簡易スクリーニングの方法を確立する。呼吸器はニワトリやウズラを保定して口を開き、綿棒を喉頭口から気管内に入れ、粘膜上皮細胞を擦り取る。一方、消化器はクロアカから直腸の粘膜を擦り取る。これをスライドガラスに塗り、塗末標本を作製してレクチン染色をする。この方法でトリ型とヒト型のインフルエンザウイルス受容体の存在を証明できるようになれば、ニワトリやウズラを殺すことなくその個体を持つ受容体の存否や量を知ることができる。

4. 研究成果

1. 系統維持されたニワトリ22系統の結果は呼吸器の線毛上皮細胞の表面にトリ型、ヒト型受容体の強い陽性反応を示した。腸管は吸収上皮細胞の線条縁にトリ型受容体の強い陽性反応を示し、ヒト型の反応は弱く散在的だった。各系統のトリ型受容体分布に差異が見られ、特にOS系統は最もトリ型受容体が少なく、受容体の量の観点から最もトリインフルエンザウイルスに感染しにくい系統であることが示唆された。MIL系統は呼吸器にてトリ型、ヒト型受容体をそれぞれ多く持ち、両ウイルスの同時感染による遺伝子再集合を引き起こし、新たなウイルスの発生の場になる可能性が高いことが示唆された。ウズラ20系統ではMAM反応の結果、呼吸器ではAMRP、NIES-Fr、NIES-L、rb-TKP系統がトリインフルエンザウイルスへの感染の可能性

が低いことが示唆された。腸管では NIES-L 系統が最も感染の可能性が低く、続いて Fawn2、NIES-Hn 系統が低いことが示唆された。トリ型受容体が最も少ない系統は NIES-L 系統で、次いで Fawn2、NIES-Hn 系統が少ないことが示唆された。ヒト型受容体が最も少ない系統は WE 系統ではあったが、SSA 反応は呼吸器、腸管の各部位で随所に確認されたため、ヒト型受容体が少ない系統を具体的に特定することはできなかった。

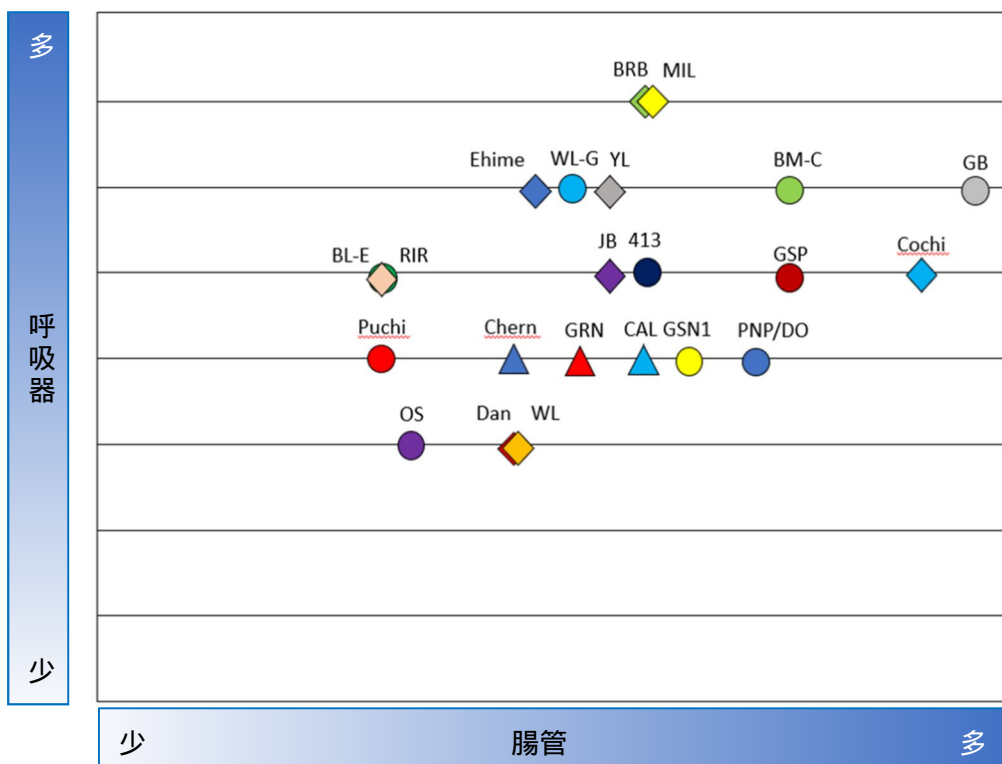


図 1。ニワトリにおけるトリ型受容体量の系統差。縦軸は気道の線毛上皮細胞、横軸は腸管の吸収上皮細胞におけるレクチン染色の濃度を数値化して比較した。



図 2。ウズラにおけるトリ型受容体量の系統差。縦軸は腸管の吸収上皮細胞、横軸は線毛上皮細胞におけるレクチン染色の濃度を数値化して比較した。

2. 野鳥では、ヒヨドリとキジバトの呼吸器でトリ型受容体の強い反応が見られ、腸管においてスズメで両受容体の反応が見られた。両受容体と同じ細胞で反応していることは、新型インフルエンザの発生に寄与している可能性を示していると考えた。カラスでは比較的弱い反応しか見ることができず、他の鳥類と比較してインフルエンザウイルスの伝播に関わる可能性は比較的低いと考えた。

ノネズミでは、呼吸器でアカネズミに比較的強い反応が見られ、クマネズミでも鼻腔でトリ型受容体の反応が見られた。腸管でアカネズミでは腸管の広い範囲にトリ型受容体の反応が見られた一方で、クマネズミでは強い反応は見られなかった。また、両種でヒト型受容体は呼吸器、腸管ともに大きな反応が見られなかった。このことから、特にアカネズミはトリ型インフルエンザウイルスの伝播に十分関わっている可能性がある。畜舎周辺に生息する野生動物では、スズメ、ヒヨドリ、キジバト、アカネズミが受容体を多く持っているため高病原性トリインフルエンザウイルスを畜舎内に持ち込む可能性が高いと考えられる。

3. 生きたニワトリの気管や直腸に綿棒を挿入して粘膜を擦り取り、細胞を採取してレクチン染色を行った。顕微鏡下で細胞塊を確認できたが、呼吸器の線毛上皮細胞や、消化管の吸収上皮細胞を同定することは困難であった。レクチン染色の結果から、その個体が持つトリインフルエンザウイルス受容体の量を判断することは可能であるので、今後この判別方法を用いてトリインフルエンザ受容体の量が少ない、すなわちトリインフルエンザに感染しにくい系統の育種が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

古田涼介、本道栄一、大森保成、トリインフルエンザ耐性ウズラの作出に向けたウズラ 20 系統のスクリーニング。日本畜産学会第 124 回大会。2018 年。

Ryosuke Furuta, Eiichi Hondo, Yasuhide Ohmori. Morphological study on the distribution of receptor for avian influenza virus in the quail. The 6th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2017.

大森保成、古田涼介、本道栄一。トリインフルエンザ感染防止に向けたウズラ系統のスクリーニング。第 160 回日本獣医学会学術集会。2017 年。

大森保成、塩崎沙織、本道栄一。トリインフルエンザ感染防止に向けたニワトリ系統のスクリーニング。第 159 回日本獣医学会学術集会。2016 年。

大森保成、中川晃孝、本道栄一。野生動物の呼吸器と腸管の粘膜上皮におけるトリとヒトのインフルエンザウイルス受容体の分布。第 158 回日本獣医学会学術集会。2015 年。

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：塩崎 沙織

ローマ字氏名：(SHIOZAKI, saori)

研究協力者氏名：古田 涼介

ローマ字氏名：(FURUTA, ryosuke)

研究協力者氏名：山田 沙恵子

ローマ字氏名：(YAMADA, saeko)