

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07737

研究課題名(和文) インフルエンザAウイルス感染におけるアライグマの病原巣としての役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a role of raccoons as reservoir in influenza A virus infection

研究代表者

今井 邦俊 (IMAI, KUNITOSHI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：70374767

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)：アライグマは人や家畜のエリアに侵入するため野生動物や人畜の病原体を伝播する病原巣になる可能性がある。本研究は、人獣共通感染症であるインフルエンザAウイルスの北海道のアライグマにおける感染状況を明らかにすることを目的とした。アライグマの胃内容物に牛飼料が含まれていたことから牛舎への侵入が確認された。ELISAを用いたインフルエンザウイルス抗体検査から、1,520頭のアライグマの1.7%で高いOD値が検出され、インフルエンザウイルス感染が示唆された。また、4頭からウイルス遺伝子が検出された。以上、アライグマは自然界においてインフルエンザウイルスの病原巣としての役割を果たす可能性が示唆された。

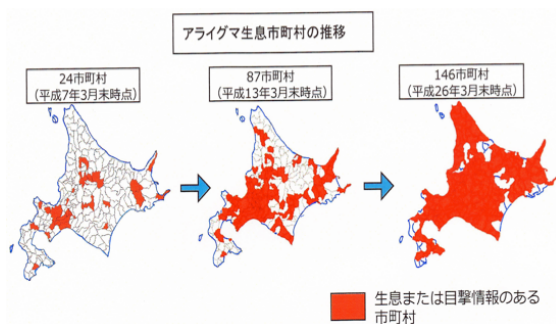
研究成果の概要(英文)：It is possible that raccoons may play a role as reservoir of pathogens derived from wildlife, human or domestic animals. In the study, influenza A virus prevalence in raccoons was examined. It seemed that raccoons invaded cattle farms, because cattle feed was found in raccoon stomachs. High OD values were detectable in 1.7% of 1,520 sera tested in ELISA, suggesting that those raccoons were infected with influenza A virus. In addition, influenza A virus genes were detected from 4 raccoons. From the results obtained, it is likely that raccoons may play a role as reservoir of influenza A virus.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：アライグマ インフルエンザAウイルス 人獣共通感染症 感染状況

1. 研究開始当初の背景

近年、人の健康を脅かす野生動物由来の新しい感染症が多く認められるようになってきた。過去60年間で野生動物の病原体に起因する人の感染症は、少なくとも144疾病に上っている。この事実は、野生動物が保有する人獣共通病原体の実態解明が、人における重篤な感染症の発生予察・防止に如何に重要であるかを示している。また、野生動物の病原体が家畜を脅かす存在であることも広く認識されており、逆に、家畜の病原体の感染を受け、他の野生動物への伝播により野生動物の生存に影響を及ぼすことも考慮されるべきである。アライグマは、日本には外来種として移入され、繁殖力の高さから日本全国で生息が認められているが、捕獲数が特に多いのは北海道と兵庫県である。北海道では1970年代後半から数が急増し、北海道全域で繁殖している(下図参照)。



アライグマは環境適応力が極めて高く、容易に人や家畜のエリアに侵入し、糞尿をまき散らしたり、時に人や家畜を咬傷することから、アライグマ固有の病原体や他の野生動物の病原体あるいは人や家畜の病原体を保有・伝播する病原巣になる可能性が指摘されている。病原体の中でもウイルスは、特に感染・伝播力が強く、野生動物由来の多くの人獣共通感染症や家畜感染症の発生に関与している。アライグマと他の宿主間で病原体の感染環が成立しているのか、機械的に病原体を運ぶだけなのか、あるいは病原巣としての役割を果たすのか情報が不足している。アライグマに感染する病原体については、主に北米において調査が行われてきた。Leptospira、canine distemper virus (CDV)、rabies virus、アライグマ回虫、インフルエンザAウイルスなどが報告されたが、多くが人獣共通病原体であった。この事実は、アライグマが広範囲な病原体の宿主になり得ることを示している。日本のアライグマにおける報告は寄生虫に関するものが多い。他にLeptospira、Salmonella、CDV、Borna disease virus、インフルエンザウイルスなどがあるが、ウイルスの分離報告はなく、殆どが抗体検査の結果である。

わが国でもアライグマからインフルエンザウイルスの複数の亜型ウイルスに対する抗体

が検出された。また同一個体で複数の亜型ウイルス抗体が検出されたことからアライグマが予想以上にインフルエンザウイルスに感受性のあることや、アライグマ間でのインフルエンザウイルス伝播の可能性も示唆された。アライグマが鳥インフルエンザウイルスや人インフルエンザウイルスに感染することが実験的に示されたこと、同一個体で複数の亜型抗体が検出されたこと、アライグマとインフルエンザウイルスの自然宿主であるカモ類の生息域が同じであることから、アライグマがインフルエンザウイルスの遺伝子再集合による新しいパンデミックウイルスの出現に関与しうる可能性が危惧される。ウイルスが分離されないためにアライグマで遺伝子再集合が起きた確証は得られていないが、これまで可能性を否定できるだけの十分な調査研究が行われていない。アライグマが自然界におけるインフルエンザウイルスの維持に病原巣としての役割を果たすことができるのか、あるいは感染は偶然の出来事であったのか不明な点が多い。もし病原巣になるとすれば、人や家畜のエリアに容易に侵入できることからアライグマは非常に危険な存在であり、継続的な調査研究による実態解明を急ぐ必要がある。

2. 研究の目的

北海道を含む日本の全域でアライグマの数が激増しているが、他の野生動物と異なりアライグマは容易に人や家畜のエリアに侵入できるために、アライグマ固有の病原体や他の野生動物の病原体あるいは人や家畜の病原体を保有・伝播する病原巣になる可能性がある。病原体の中でもウイルスは、特に感染・伝播力が強く、野生動物由来の多くの人獣共通感染症や家畜感染症の発生に関与している。本研究では、代表的な人獣共通病原体であるインフルエンザAウイルスの北海道のアライグマにおける感染状況について、これ迄の知見に加えて新たに科学的データを蓄積し、アライグマの病原巣としての役割と公衆衛生上の意義を明らかにすると共に、アライグマ媒介性感染症の予察・予防対策を確立するための知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 北海道十勝地域におけるアライグマの捕獲と研究材料の採取および捕獲情報を収集する。

(2) 捕獲アライグマの鼻腔および直腸スワブからの発育鶏卵接種法によるインフルエンザウイルスの分離を実施する。10~11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内にスワブ材料を接種し、4日間孵卵する。回収した尿膜腔液について赤血球凝集(HA)試験を実施し、結果が陰性の場合には回収尿膜腔液を新たに発育鶏卵に接種する(継代)。最終的にHA試験が陰性の場合にはウイルス分離を陰性とする。

(3) 鼻腔および直腸スワブからインフルエンザウイルスのM遺伝子を標的とする real-

time RT-PCR、あるいはMおよびNP 遺伝子を標的とする conventional RT-PCR を用いて、鼻腔および直腸スワブから M 遺伝子の検出を実施する。

(4) インフルエンザウイルス抗体検出法として ELISA の確立および本法を用いた抗体検出を実施する。発育鶏卵で増殖させた H1N1 亜型、H3N8 亜型および H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスを 30%および 60%シュークロスを用いて精製した。精製ウイルスを界面活性剤で可溶化し、ELISA 抗原とした。確立した ELISA を用いて、2010～2016 年に十勝地域で捕獲されたアライグマの血清 238 サンプルからインフルエンザウイルス抗体の検出を試みる。また、研究開始前に保存されていた 2003～2005 年に北海道の中部地域で捕獲されたアライグマの血清 1,271 サンプルを用いた回顧的血清学的調査を行う。

(5) アライグマからウイルス分離を行うためにアライグマの腎臓あるいは精巣を用いて初代培養細胞を作製し、インフルエンザウイルス分離おける有用性を調べる。

4. 研究成果

(1) 研究期間中に十勝地域の 1 市 3 町において捕獲され、殺処分された 400 頭のアライグマを大学の解剖施設に搬入し、アライグマから鼻腔および直腸スワブ、血清を採取した。一部のアライグマは、全ての実験材料を採取できないほど、死体の保存状態が悪かった。一部のアライグマについて胃内容を調べたところ、鳥の羽毛あるいは牛の飼料が見つかった。このことから、アライグマが野鳥を捕獲していることや牛舎に侵入していることが判明した。

(2) 400 頭のアライグマから採取された鼻腔あるいは直腸スワブを 10～11 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種後 2 代継代したが、インフルエンザウイルスは分離されなかった。

(3) real-time RT-PCR による M 遺伝子の検出では、明確な陽性反応を得ることができなかったが、4 頭のアライグマ(個体名 Raccoon A～D)の鼻腔あるいは直腸スワブからインフルエンザウイルスの M 遺伝子が検出された(表 1)。Raccoon A は、河川の側の牛舎で捕獲された幼獣のアライグマであった。Raccoon B～D はまだ哺乳中の兄弟であったが、Raccoon A とは 30 km 離れた牛舎で捕獲された(図 1)。

Raccoon A の鼻腔スワブから M および NP 遺伝子が検出された。Raccoon B と D の直腸スワブから M および NP 遺伝子が検出された。Raccoon C の直腸スワブから M 遺伝子が検出された。Raccoon B～D から検出された M 遺伝子の塩基配列は同一であったが、Raccoon A の配列と異なっていた。また、Raccoon B と D の塩基配列も同一であった。Raccoon B～D は、その体重(0.31～0.35kg)から推測して生後 2 週齢頃のアライグマと考えられた。この週齢では母親から離れて移動することはないこと

から、感染源として母獣が考えられた。この結果から、アライグマの間においてインフルエンザウイルスが伝播されている可能性が示唆された。

M 遺伝子の系統樹解析の結果から、Raccoon A と Raccoon B～D は、それぞれ大きく異なる遺伝子グループに分離された。Raccoon A は鳥インフルエンザウイルスに近く、Raccoon B～D はヒトインフルエンザウイルスと同じグループに分類された。同様に、NP 遺伝子の系統樹解析の結果から、Raccoon B と D はヒトインフルエンザウイルスと同じグループに分類されることが分かった。

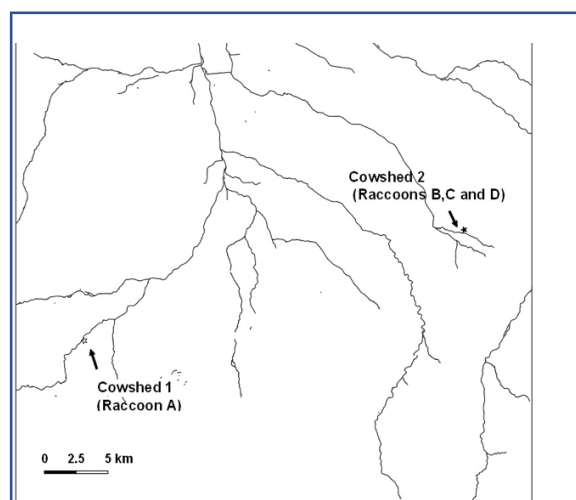


図 1 アライグマの捕獲場所

表 1. RT-PCR によるアライグマの鼻腔および直腸スワブからのインフルエンザウイルス M および NP 遺伝子の検出

個体 番号	M 遺伝子検出		NP 遺伝子検出	
	鼻腔	直腸	鼻腔	直腸
A	陽性	陰性	陽性	陰性
B	陰性	陽性	陰性	陽性
C	陰性	陽性	陰性	陰性
D	陰性	陽性	陰性	陽性

(4) 合計 1,291 血清について、ELISA を用いてインフルエンザウイルス抗体の検出を試みた。OD 値 1 以上を示した血清が十勝地域で 3 サンプル、北海道中部地域で 10 サンプル、 $0.7 < OD 値 < 1$ を示した血清が十勝地域で 6 サンプル、北海道中部地域で 19 サンプル、 $0.4 < OD 値 < 0.7$ を示した血清が十勝地域で 19 サンプル、北海道中部地域で 123 サンプルあった。しかし、明らかに抗体陰性が証明されているアライグマの陰性血清が利用できないために、抗体陽性限界のカットオフ値を明確に決定できないので、測定された OD 値のうちどのサンプルが真に抗体陽性であるかどうか判定が困

難であった。インフルエンザウイルスには、抗原性状が異なる多数の亜型ウイルスが知られている。今後、ほかの血清学的診断法を用いて、今回の ELISA で得られた結果を確認する予定である。

(5) アライグマ由来培養細胞がアライグマからのインフルエンザウイルスの分離に適しているかどうかを検討した。幼齢のアライグマの腎臓あるいは精巣を採取して初代培養細胞の作製を試みた。その結果、腎臓の初代培養細胞の作製に成功したが、通常、インフルエンザウイルスの培養に用いられている MDCK 細胞とウイルス増殖に対する感受性を調べたところ、アライグマの初代培養細胞におけるウイルス増殖はあまりよくなかった。

本研究において、アライグマからインフルエンザウイルスを分離することは出来なかったが、世界で初めてアライグマからインフルエンザウイルス遺伝子の検出に成功した。全国で、アライグマの数が激増している。アライグマは、ウイルス、細菌などの種々の病原体に感染することが既に知られている。アライグマは、容易に人や家畜の存在するエリアに自然界からアクセスすることができる生態を示す。この性状は、アライグマが種々の病原体を伝播することができることを示唆している。今後もアライグマの駆除と病原体の感染巣としての役割についての解明が必要である。

本研究において、発育鶏卵を用いてアライグマからのインフルエンザウイルスの分離を試みたが、残念なことに分離に成功しなかった。しかし、赤血球凝集性を示すエージェントが何株か分離された。しかし、発育鶏卵における継代では、増殖が不安定であった。赤血球凝集性を示す卵の尿腔液を哺乳動物由来株化細胞である Vero 細胞、MDBK 細胞、MDCK 細胞、HRPT 細胞、HmLu-1 細胞に接種したがウイルスは分離できなかった。しかし、鶏胚腎臓細胞と鶏胚線維芽細胞でウイルス分離に成功した。本ウイルスは赤血球凝集性を示すと共に、シンシチュウムを形成した (図 2)。鶏胚腎臓細胞と鶏胚線維芽細胞の本ウイルスに対する感受性を調べたところ、鶏胚線維芽細胞が非常に高い感受性を示した。

今後、分離ウイルスの同定を進め、アライグマ固有の病原体であるのかどうか検討すると共に、本ウイルスの存在意義についても検討を進める予定である。



図 2. 鶏胚線維芽細胞においてみられたシンシチュウム

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)

Yamaguchi Emi, Fujii Kei, Ogawa Haruko, Imai Kunitoshi, First detection of influenza A virus genes from wild raccoons in Japan, Virus Genes, 査読有、DOI:<https://doi.org/10.1007/s11262-018-1566-z>, 2018

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 邦俊 (IMAI, Kunitoshi)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：70374767

(2) 研究協力者

浅川 満彦 (ASAKAWA, Mitsuhiro)
山口 英美 (YAMAGUCHI, Emi)
松田 祥子 (MATSUDA, Sachiko)