

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K08019
研究課題名(和文) 気管器官培養を用いた野生水禽由来インフルエンザウイルスの鶏への適応に関する研究

研究課題名(英文) The adaptive mechanism of waterfowl-origin avian influenza virus to chicken respiratory epithelial cells using trachea organ culture

研究代表者
笛吹 達史 (USUI, Tatsufumi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80508482
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)：鳥インフルエンザウイルスの鶏への適応機序の解明を試みた。鶏胚気管リングを用いた器官培養法では多くの亜型の野生水禽由来株の増殖が認められた。H7およびH9亜型ウイルスの連続継代によって得た気管上皮で増殖するように変化した継代株で、NP遺伝子への変異導入が共通して認められたことから、鶏への感染性獲得にNP蛋白質の働きが関与することが示唆された。しかし、鶏への接種試験で感染は成立せず、気管器官培養では再現されない何らかの宿主因子への適応が必要であることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中のニワトリで流行し、時にヒトへの感染も問題となっている「鳥インフルエンザ」は、もともと自然宿主である野生水禽が保有していたインフルエンザウイルスが、家禽であるニワトリに適応したことから始まっている。その適応機序を解明することは、現在ニワトリで流行しているH9、H5、H7亜型ウイルスの制御に加え、今後ニワトリで流行するかもしれない他の亜型のウイルスへの対策に必要な基礎情報を提供する。本研究では、適応機序の解明には至らなかったが、多様な亜型のインフルエンザウイルスが培養条件下でニワトリ呼吸器上皮で増殖できることが示され、ニワトリにも適応する可能性のあることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is to elucidate the adaptive mechanism of waterfowl-origin avian influenza viruses to chicken. Most HA subtypes of avian influenza viruses propagated by chicken embryonic trachea organ culture(TOC). After serial passage of an H7 and two H9 subtype viruses in TOC, mutations were commonly introduced to NP genes of variants with increased ability to propagate in TOC, suggesting the relation of NP function to adaptation of influenza viruses to chicken respiratory epithelial cells. However, no chickens were infected with these variants by experimental inoculation. It was suggested that additional factors may be required for wild waterfowl-derived avian influenza viruses to adapt to poultry chicken.

研究分野：動物ウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス 自然宿主 鶏 器官培養 適応変異 気管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「鳥インフルエンザ」は、オルソミクソウイルス科インフルエンザウイルス A 属の A 型インフルエンザウイルス感染によって起こる家禽の感染症である。A 型インフルエンザウイルスは、PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M および NS の計 8 分節からなるマイナス一本鎖 RNA をゲノムとして持っており、ウイルスエンベロープ上の 2 種類の糖蛋白質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、H1~H16 および N1~N9 の亜型に分けられる。A 型インフルエンザウイルスの宿主域は広く、ヒト、ブタやウマなどの哺乳動物から、野生水禽やニワトリなどの鳥類まで分布している。鳥類から分離される A 型インフルエンザウイルスを鳥インフルエンザウイルスと呼ぶが、全ての A 型インフルエンザウイルスのもととの自然宿主は、カモなどの野生水禽類と考えられている。

ニワトリやウズラなどの家禽で流行するインフルエンザウイルスも野生水禽に由来すると考えられるが、野生水禽から分離されるインフルエンザウイルスは、直接ニワトリに感染しにくいことが知られている。1 つの仮説として、野生水禽から、中間宿主のような役割を担うウズラやアヒルに偶発的に伝播したウイルスが集団内で感染を繰り返すことで、ニワトリでも増殖できるウイルスが選択され、ニワトリに感染するようになると考えられている。NCBI が公開しているインフルエンザウイルス塩基配列データベースに登録されているニワトリ (chicken) 分離株の HA 分節数は、H9 亜型が 7,958 株と最も多く、H5 亜型 3,570 株、H7 亜型 1,287 株、H6 亜型 226 株、H10 亜型 163 株、H3 亜型 45 株、H2 亜型 32 株、H8 亜型 22 株、H4 亜型 15 株、H1 亜型 12 株、H11 亜型 6 株と続き、H12 亜型から H16 亜型の登録数は 0 である。ここから、H9 亜型、H5 亜型、H7 亜型のウイルスがニワトリに適応し、流行している実態が推察される。

ニワトリに適応したインフルエンザウイルスは、ニワトリの上部気道にある気管上皮細胞で主に増殖する。インフルエンザウイルスは、ガラクトースと 2,3 結合したシアル酸 (Sia 2,3Gal) あるいは 2,6 結合したシアル酸 (Sia 2,6Gal) を非還元末端にもつ糖鎖をレセプターとして認識する。野生水禽の消化管の粘膜上皮細胞には両方のレセプターが分布している。ニワトリ気管上皮細胞にも Sia 2,3Gal が発現しているにも関わらず、野生水禽から分離したインフルエンザウイルスがニワトリ上部気道で増殖しにくい理由として、より近位の糖鎖結合様式や修飾パターンが野生水禽とニワトリで異なることが考えられている。鳥インフルエンザウイルスがニワトリ気管上皮細胞で増殖できるようになるためには、ニワトリの気道に特有なウイルスレセプターの微細な糖鎖構造の違いを認識できるよう変化する必要があるのかもしれない。

これまで、鳥インフルエンザウイルスのニワトリへの適応メカニズムについて、ニワトリを用いた継代実験により、NA 蛋白質のストーク領域欠損や HA 蛋白質への糖鎖付加など、ニワトリへの適応に寄与するいくつかの変異が報告されている。しかし、このような *in vivo* 実験の場合、気管上皮細胞での増殖能というウイルス要因以外にも、ウイルスに対する免疫応答や個体差といった様々な宿主要因を含む適応であることを考慮する必要がある。その点で、気管上皮細胞でのウイルス増殖性を評価する方法として、気管の *ex vivo* 培養が適していると考えられる。気管リングを用いた器官培養法 (TOC) は、ブタのオーエスキー病やイヌのボルデテラ症の研究等で活用されている方法であり、インフルエンザウイルスの研究にもしばしば用いられている。鶏胚 TOC は、1970 年代にニワトリの伝染性気管支炎の研究で用いられ、近年、インフルエンザウイルス研究にも利用されたこともある。

2. 研究の目的

本研究では、A 型インフルエンザウイルスのニワトリへの適応機序解明を目的に、鳥インフルエンザウイルスのニワトリ気管上皮細胞での増殖能獲得メカニズムについて明らかにすることを試みた。H1~H16 亜型のインフルエンザウイルス野生水禽分離株について、鶏胚気管の器官培養法 (TOC) におけるウイルス増殖性を解析し、組織学的に増殖部位の検討を行った。さらに、鶏胚 TOC での増殖性が低い H7 亜型および H9 亜型ウイルスを、鶏胚 TOC で連続継代することで高い増殖性を示す継代変異株を作出し、増殖性の変化に伴うウイルスゲノムの変異について解析することで、ニワトリ気管上皮細胞での増殖能獲得に関わるウイルス要因の解明 (アミノ酸変異の同定) を試みた。継代変異株を用いたニワトリへの感染実験を実施し、継代によって導入された変異がニワトリへの感染性に寄与するかどうかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 鶏胚気管リングを用いた器官培養法の構築

20~21 日齢鶏胚の気管を McILWAIN TISSUE CHOPPER で喉頭側から 0.4mm 幅に横断し、鶏胚気管リングを作成、0.3%BSA 添加 E-MEM 培地を用いて 37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。

(2) 鶏胚気管器官培養法を用いたインフルエンザウイルス増殖性の検討

H1~H16 亜型のインフルエンザウイルス野生水禽分離株、H9 亜型ニワトリ分離株および H3 亜型ブタ分離株の鶏胚 TOC での増殖性を評価した。一部の気管リングから組織標本を作製した。

(3) 鶏胚気管器官培養法を用いたインフルエンザウイルスの連続継代

H7N7 亜型ウイルス 1 株 (A/pintail/Okayama/60/2008 : Okay08 株)、H9N2 亜型ウイルス 2 株

(A/duck/Hokkaido/26/99 : Hokk99 株、A/duck/Miyazaki/450110/2016 : Miya16 株) を選択し、鶏胚 TOC で、9~12 代の連続継代を行った。継代ウイルス名は、各株名の後に、鶏胚気管 (Trachea) による継代を意味する CETr と継代数を示す数字を付けて表記した。例えば、Okay08 株を鶏胚気管で培養して得られた継代株は Okay08-Tr1 株、Okay08-Tr1 株を鶏胚気管で培養して得られた継代株は Okay08-Tr2 株となる。

(4) 鶏胚気管継代ウイルスのウイルスゲノム RNA 塩基配列の決定 (アミノ酸配列の推定)

ウイルス RNA の抽出には QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を使用し、Uni12 プライマー (5'-AGCAAAAGCAGG-3') を用いて、逆転写反応を行った後、ポリメラーゼ連鎖反応によって、インフルエンザウイルス 8 分節を増幅した。得られた PCR 産物を鋳型としてシーケンシング反応を行い、DNA シーケンサー (3130 Genetic Analyser) を用いて決定したウイルスゲノムの塩基配列からアミノ酸配列を推定した。

(5) 鶏胚気管リングにおけるウイルス増殖部位の組織学的検索

鶏胚気管リングの組織標本を用いて、HE 染色、マウス抗インフルエンザ M1 蛋白抗体による免疫染色、インフルエンザウイルスの糖鎖レセプター検出のためのレクチン染色を行った。レクチン染色には、Sia 2,6Gal を検出するために FITC 標識 SNA レクチン、Sia 2,3Gal 1,4GlcNAc を検出するためにビオチン標識 MAL-I レクチン、Sia 2,3Gal 1,3GlcNAc を検出するためにビオチン標識 MAL-II レクチンを用い、各レクチンが検出する糖鎖特異的に結合していることを確認するため、ノイラミニダーゼ処理した標本でも同様にレクチン染色を行った。

(6) 鶏胚気管継代ウイルスのニワトリ感染実験

Hokk99 株および Hokk99 株を鶏胚気管リングで 9 代継代して得られた Hokk99-CETr9 株ならびに Miya16 株および Miya16 株を鶏胚気管リングで 9 代継代して得られた Miya16-CETr9 株を用いて、ニワトリ気管内接種感染実験を実施した。1 週齢 SPF ニワトリ 3~5 羽に、 10^6 TCID₅₀/0.1ml に調製した各ウイルス液を 0.1ml 気管内投与後、経時的に咽喉頭スワブおよびクロアカスワブを採取し、MDCK 細胞でのウイルス分離に供した。また、14 日間程度の観察期間終了後、血清を採取し、赤血球凝集阻止 (HI) 試験による HI 抗体の検出に用いた。本動物実験は、鳥取大学における動物実験規則等に適合し承認された動物実験計画に従って実施した (鳥取大学動物実験計画書承認番号 18-T-7、2018 年 4 月 18 日承認)。

4. 研究成果

(1) 鶏胚気管でのシアル酸分布

鶏胚気管上皮細胞での Sia 2,3Gal および Sia 2,6Gal の発現状況が、生体のニワトリ気管上皮細胞のシアル酸発現状況を反映しているか検討するため、レクチン染色を行った。Sia 2,3Gal 1,4GlcNAc を検出するレクチンである MAL-I レクチン (図 1A) および Sia 2,6Gal を検出する SNA レクチン (図 1C) のいずれかで染色した場合も、気管の全長にわたって蛍光が検出された。この標的糖鎖の存在を示す蛍光は、ノイラミニダーゼで処理した後の標本において完全に消失したことから (図 1B、D) Sia 2,3Gal 1,4GlcNAc および Sia 2,6Gal 特異的な蛍光であることが確認された。Sia 2,3Gal 1,3GlcNAc を検出する MAL-II レクチンで染色した場合も、気管全長で蛍光が検出されたが、ノイラミニダーゼ処理で蛍光の消失が認められず、標的糖鎖による特異的な反応であったかどうか確認できなかった。

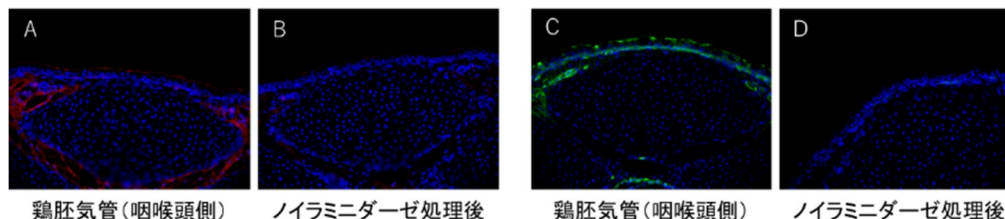


図 1、レクチン染色によるシアル酸レセプター (糖鎖) の検出

(2) 野生水禽分離ウイルスの鶏胚気管リングにおける増殖

接種 24 時間後の鶏胚 TOC 培養上清中ウイルス感染価は、陽性対照として用いた A/chicken/Vietnam/38T-1/2006 (H9N2) で $10^{5.9}$ TCID₅₀/0.1ml、陰性対照として用いた A/swine/Miyagi/2/2006 (H3N2) では検出限界以下 ($<10^{0.5}$ TCID₅₀/0.1ml) であった (図 2)。H1~H16 亜型の野生水禽分離株 24 株を接種したところ、24 株中 22 株でウイルス増殖が認められ、そのウイルス感染価は株により異なった。ニワトリ分離株と同程度に増殖した株が多数ある一方、A/swan/Shimane/238/99 (H2N4)、A/duck/Tottori/H23/2014 (H8N4)、A/mallard/Astrakhan/263/1982 (H14N5)、A/duck/Australia/341/1983 (H15N8) の 4 株では、ウイルスを接種した気管リング 4 個中 1~2 個でのみウイルスが検出され、

A/duck/Hokkaido/26/99(H9N2)およびA/duck/Hokkaido/WZ82/2013(H16N3)では、全ての気管リングで検出限界値未満 ($<10^{0.5}$ TCID₅₀/0.1ml) であった。

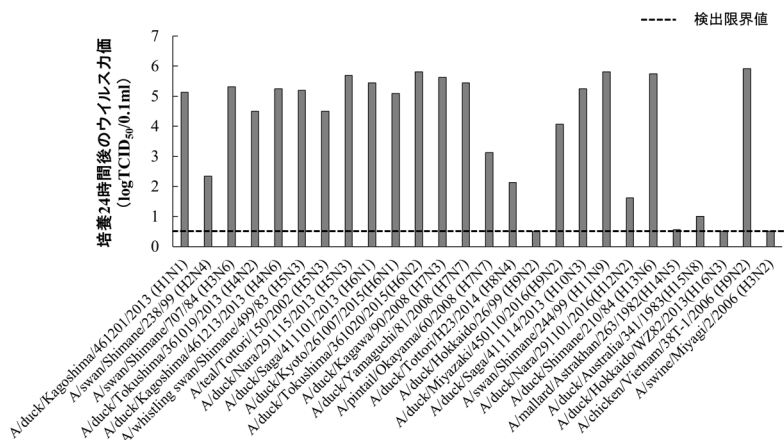


図 2、鶏胚気管リング培養上清中の接種 24 時間後のウイルス感染価

線毛運動障害と気管上皮細胞の変性には相関が見られ、重度の線毛運動障害を示した株では気管上皮細胞の変性像が確認された (図 3A、C)。いずれの株も、ウイルス抗原陽性細胞は気管上皮細胞であった (図 3B、D)。

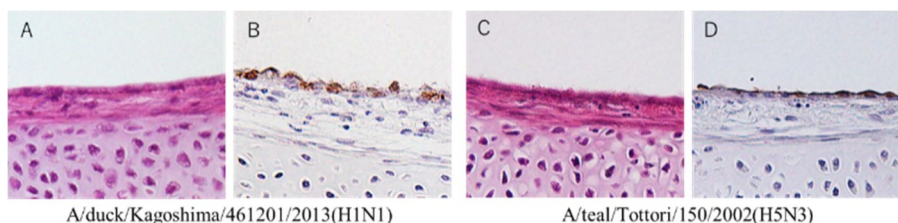


図 3、ウイルス接種 24 時間後の鶏胚気管リングの HE および免疫染色像

(3) 野生水禽分離株の鶏胚気管リング継代に伴う増殖性の変化

野生水禽由来鳥インフルエンザウイルスのニワトリ上部気道への適応機序を明らかにする目的で A/pintail/Okayama/60/2008(H7N7) (Okay08 株) を 12 代、A/duck/Hokkaido/26/99(H9N2) (Hokk99 株) および A/duck/Miyazaki/450110/2016(H9N2) (Miya16 株) を 9 代、鶏胚 TOC で継代した。

A/pintail/Okayama/60/2008(H7N7)の鶏胚気管リング継代

接種 24 時間後の培養上清中ウイルス感染価は、継代前の Okay08 株では $10^{3.1}$ TCID₅₀/0.1ml、Okay08-CETr4 株では $10^{4.4}$ TCID₅₀/0.1ml、Okay08-CETr12 株では $10^{5.8}$ TCID₅₀/0.1ml と、増加する傾向が認められ、Okay08 株と継代後のウイルス感染価を比較すると、Okay08-CETr5 株以降で有意な上昇が認められた (図 4A)。Okay08 株および Okay08-CETr12 株のウイルス増殖性を比較したところ、接種 8、24、36 および 48 時間後のウイルス感染価に有意な差が認められた (図 4D)。

A/duck/Hokkaido/26/99(H9N2)の鶏胚気管リング継代に伴う増殖性の変化

Hokk99 株の接種 36 時間後の培養上清中ウイルス感染価は、継代前で $10^{2.8}$ TCID₅₀/0.1ml、Hokk99-CETr3 株で $10^{5.2}$ TCID₅₀/0.1ml まで増加し、その後は Hokk99-CETr9 株まで 10^5 TCID₅₀/0.1ml 前後のウイルス感染価で推移した (図 4B)。Hokk99 株と Hokk99-CETr9 株のウイルス増殖曲線の比較では、接種 8 時間以降のウイルス感染価に有意差が認められた (図 4E)。

A/duck/Miyazaki/450110/2016(H9N2)の鶏胚気管リング継代に伴う増殖性の変化

Miya16 株の接種 24 時間後の気管リング培養上清中ウイルス感染価は、継代前に $10^{4.1}$ TCID₅₀/0.1ml、継代に伴って少しずつ上昇し、Miya16-CETr9 株では $10^{5.6}$ TCID₅₀/0.1ml となった。Miya16 株と継代株を比較すると、Miya16-Tr1 株と Miya16-Tr6 株以降の継代株でウイルス感染価の有意な上昇が認められた (図 4C)。Miya16 株と Miya16-CETr8 株における鶏胚気管リング培養上清中のウイルス感染価の比較で有意な違いは認めなかった (図 4F)。

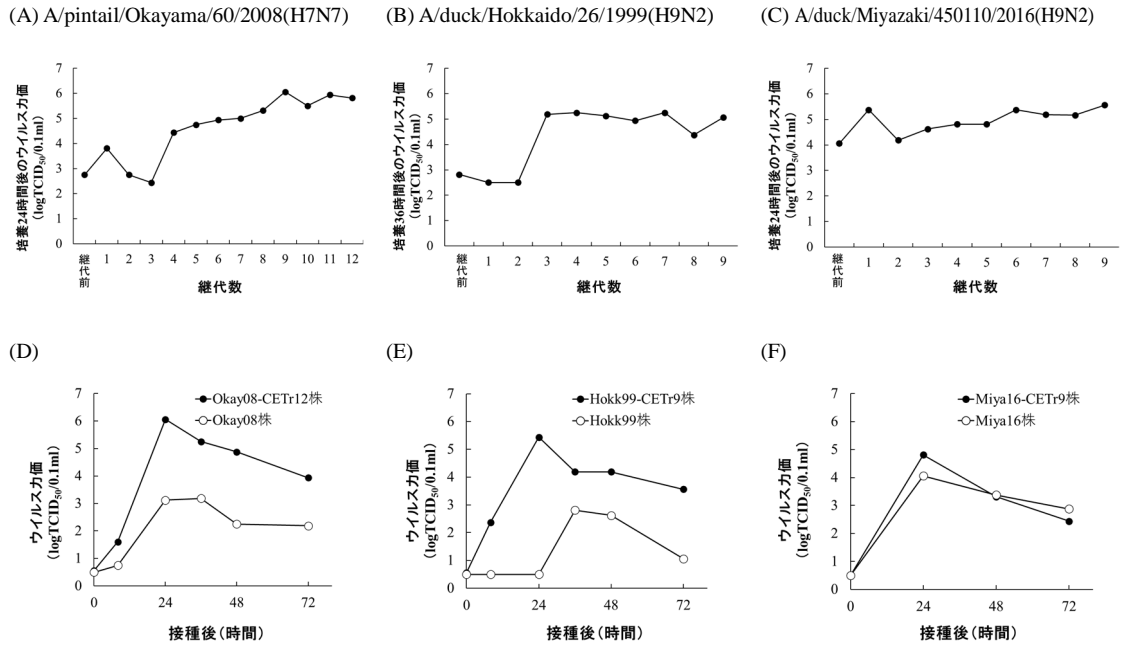


図 4. 鶏胚気管リング継代による増殖性の変化

(4) 野生水禽分離株の鶏胚気管リング継代に伴う推定アミノ酸配列の変化

鶏胚気管リングで連続継代した野生水禽由来インフルエンザウイルスの継代前と本研究での最終継代後の推定アミノ酸配列を比較したところ、A/pintail/Okayama/60/2008(H7N7)ではHA蛋白質で3か所、NP蛋白質で1か所、A/duck/Hokkaido/26/99(H9N2)ではHA蛋白質で1か所、NP蛋白質で1か所、A/duck/Miyazaki/450110/2016(H9N2)でNP蛋白質の1か所に、アミノ酸置換を伴う塩基配列の変異が認められた(表1)。

表1. 野生水禽分離株の鶏胚気管リング継代に伴う推定アミノ酸配列の変化

	Okayama08(H7N7) [12継代実施]			Hokkaido99(H9N2) [9継代実施]		Miyazaki16(H9N2) [9継代実施]	
	HA	NP		HA	NP	NP	
継代前	169	212	516	359	455	105	354
継代後	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn	Ser	Pro
	Asp	Lys	Glu	Ser/Tyr	His	Val	Ser

(5) 野生水禽由来インフルエンザウイルス鶏胚気管リング継代のニワトリへの感染性

Hokk99株およびHokk99-CETr9株のニワトリへの気管内投与

Hokk99株またはHokk99-CETr9株の気管内投与後、16日間の観察期間中、ニワトリは特段の症状を示さなかった。咽喉頭スワブでは、接種1日後の全てのニワトリから低感染価のウイルスが検出されたが、接種3日後ではHokk99-CETr9株接種群5羽中1羽からのみ、きわめて低い感染価のウイルスが検出され、残り4羽からウイルスは検出されなかった。全ての個体のクロアカスワブからウイルスは検出されなかった。ウイルス増殖を認めなかったことに加えて、観察期間終了後に採取した血清中にHI抗体が検出されなかったことから、両株ともに感染は成立しておらず、Hokk99-CETr9株はニワトリへの感染性獲得には至っていないと判定した。

Miya16株およびMiya16-CETr9株のニワトリへの気管内投与

Miya16株またはMiya16-CETr9株の接種後、14日間の観察期間中、ニワトリは特段の症状を示さず、咽喉頭スワブからもクロアカスワブからもウイルスは検出されなかった。ウイルス接種14日後に採取した血清中にHI抗体産生を認めなかったことから、両株ともに感染は成立せず、Miya16-CETr9株についてもニワトリへの感染性獲得には至っていないと判定した。

(6) まとめ

鶏胚気管リングで増殖するようになった継代株で、NP蛋白質にアミノ酸変異が認められたことから、野生水禽由来鳥インフルエンザウイルスのニワトリ気管上皮細胞における増殖性獲得にはNP蛋白質の機能的な変化が関与することが推察された。しかし、ニワトリ個体への感染性獲得に至らなかったことから、鳥インフルエンザウイルスのニワトリ呼吸器への適応には、今回認められた増殖性の上昇に加え、宿主特異性に関わる変異や、気管リング培養では再現されない何らかの宿主因子への適応変異など、さらなる変異の蓄積を必要とする可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亀田美帆、岡村萌黄、笛吹達史、伊藤啓史、伊藤壽啓、山口剛士
2. 発表標題 気管リング培養法を用いた鳥インフルエンザウイルスH9N2亜型野鳥由来株のニワトリへの適応機序解明
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----