

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05042

研究課題名(和文) D型インフルエンザウイルスとウシ呼吸器病症候群の関連性の解明

研究課題名(英文) Study of the association between influenza D virus and bovine respiratory distress syndrome.

研究代表者

村上 晋 (Murakami, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10636757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：わが国のウシにおけるD型インフルエンザウイルス感染の実態を調査する目的で、日本にはこれまで報告されたD型インフルエンザウイルスとは異なる遺伝学的系統のウイルスが存在していることを明らかにした。さらにこの新しいウイルスを分離し、抗原性を解析したところ既知の遺伝学的系統の分離株とは異なる抗原性を持つことがわかった。

また、ウイルス性状の解析するために重要なツールであるリバースジェネティクス系を開発し、任意の変異を導入したD型インフルエンザウイルスの作製を可能にした。さらにこのリバースジェネティクス系を用いて、8分節化したウイルスを作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分離した日本株の独自性についての知見は、ワクチン開発におけるウイルス株選択の重要性を示している。また確立したD型インフルエンザウイルスの最適化したリバースジェネティクス技術は、任意のゲノム改変技術として、例えば、変異ウイルスを用いたウイルス増殖過程の解析やウイルス抗原性の解析などに活用できる。さらに、本技術は、呼吸器感染症であるD型インフルエンザのワクチン開発において、感染防御能をもつ粘膜抗体を誘導できる理想的な弱毒生ワクチン株の作出を可能にすることで、世界中で被害を及ぼしているBRDCの制御に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the epidemiological status of influenza D virus infection in cattle in Japan, we detected a strain of influenza D virus in Japan that was phylogenetically different from the previously reported strains of influenza D virus. Furthermore, we isolated this new virus and we found that the new strain was antigenicity different from previously known strains.

We also successfully developed a reverse genetics system of influenza D virus, which is an important tool for analyzing viral properties. Furthermore, using this reverse genetics system, we succeeded in producing an 8-segmented virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：D型インフルエンザウイルス 牛呼吸器病症候群 リバースジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

2011年、米国オクラホマ州の牧場で飼育されていた呼吸器疾患のあるブタから、新しいインフルエンザウイルスが分離された (Hause et al., PLoS Pathog 2013)。遺伝子・抗原解析によりこの分離ウイルスは既知のインフルエンザウイルス (A~C型) とは異なる性質を示し、D型インフルエンザウイルスという新奇の分類位置が提唱され (Hause et al., mBio 2014)、2016年9月に国際ウイルス分類委員会 (ICTV) により正式に認められた。米国におけるその後の調査により、D型インフルエンザウイルスは、本来はウシの病原体であり、ウシ呼吸器病症候群 (BRDC) の患畜から高頻度でウイルス遺伝子が検出されることから、BRDCの原因ウイルスの一つである可能性が示されている (Hause et al., mBio 2014)。

BRDCはストレスなどの環境要因下で、ウイルス感染を起因として、細菌の二次感染によって重症化する疾病である。BRDCは米国でのウシの死亡原因の第一位である (Hilton, Anim Health Res Rev 2014)。BRDCの制御は現在の畜産業、食肉産業における解決すべき最重要課題の一つであり、早急な対策が求められている。現行のBRDCの予防ワクチン (D型インフルエンザウイルス抗原を含まない) は実際にフィールドでも用いられているが、その効果は確実ではない。D型インフルエンザウイルスが初めて分離された米国では、複数の血清疫学調査や遺伝子検出が実施されている。それによると、ウシのD型インフルエンザは少なくとも2004年から存在しており、米国内の多くの州に広く侵淫していることが示されている。D型ウイルスはウシへの感染実験により単独で呼吸器疾患を引き起こすことが示された (Ferguson et al., J Virol 2016)。米国以外でも、フランス (Ducatez et al., Emerg Infect Dis 2015)、中国 (Jiang et al., Virus Genes 2014)、イタリア (Chiapponi et al., Emerg Infect Dis 2016)、メキシコ (Mitra et al., J Gen Virol 2016) において呼吸器疾患のウシやブタからこのウイルスが検出されていることから、すでに世界規模で侵淫していると考えられている。さらに米国ではD型ウイルスに対する特異抗体がヒツジやヤギでも見つかり、(Quast et al., Vet Microbiol 2015) 家畜全般に対する考慮すべき病原体である可能性が高い。

わが国でのD型ウイルスの流行状況は、申請者たちが初めて明らかにし報告した。呼吸器症状を呈するウシからD型ウイルスが検出され、系統樹解析の結果、これまでに他国で分離された株と遺伝的に異なることを明らかにした (Murakami et al., Emerg Infect Dis 2016)。

### 2. 研究の目的

本研究では、わが国のウシなどの家畜におけるD型インフルエンザウイルス感染の実態を調査し、そのBRDCとの関連性や、日本に存在するD型インフルエンザウイルスの生物性状を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 呼吸器疾患牛から新しい遺伝学的系統のD型インフルエンザウイルスの分離

2019年1月に、山形県の農場で呼吸器症状を呈したホルスタイン9頭から、鼻腔スワブを採取した。D型ウイルスのPB1遺伝子の特異的に検出するリアルタイムRT-PCRによって検査した。陽性検体をヒト結腸ガン由来HRT-18G細胞に続いてブタ精巣由来ST細胞にすることでウイルス分離を試みた。また陽性検体の全ゲノムシーケンスを決定し、最尤法による系統樹解析をした。

#### D型インフルエンザウイルスリバーシジェネティクス法の開発

D型インフルエンザウイルス D/swine/Oklahoma/1334/2011株 (OK株) の全7分節ゲノムをRNA発現用のpHH21ベクターに組込んだ。またPB2, PB1, P3, NPタンパク質発現プラスミドも作製した。これら11種のプラスミドHRT-18G細胞にトランスフェクションした。3-4日後に培養上清を回収し、ST細胞に接種した。さらに3-4日後に上清を回収し、リアルタイムRT-PCR、赤血球凝集試験、抗体による感染細胞染色によってウイルスレスクューを確認した。さらに作製したウイルスを超遠心で濃縮後RNA抽出し、各ゲノム分節をノーザンブロットによって検出・定量した。

#### 8分節改変ゲノムを持つ組換えD型インフルエンザウイルスの作出

OK株のNS分節をNS1とNS2分節に分割したRNA発現プラスミドを作製した。これらプラスミドとで作製したNS分節RNA発現プラスミドを除く10種のプラスミドの合計12種をHEK293T細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

### 4. 研究成果

## 呼吸器疾患牛から新しい遺伝学的系統の D 型インフルエンザウイルスの分離

2019 年 1 月に、山形県の農場で呼吸器症状を呈したホルスタイン 9 頭から、鼻腔スワブを採取し、D 型ウイルスゲノムを特異的に検出するリアルタイム RT-PCR によって検査した。その結果、9 頭すべてが陽性であり、D 型ウイルスの感染が認められた。一方、他のウイルス病原体の感染は認められなかった。次に、陽性検体についてウイルスゲノムの全塩基配列を決定し、進化系統樹解析をしたところ、検出された D 型ウイルスはこれまでに報告のある 3 系統のいずれにも属していないことがわかった(図 1)。さらに、スワブ検体を培養細胞に接種することで、ウイルスの分離にも成功した。この分離ウイルスの抗原性について、作出した抗 HEF モノクローナル抗体パネルを用いて調べたところ、既知の 3 系統に属するウイルス株とは HEF 抗原性に違いがあることがわかった。

今回検出・分離した D 型インフルエンザウイルスは、既知のウイルス株とは異なる第 4 の遺伝学的系統を形成することが明らかとなった。つまり、わが国には複数の遺伝学的系統に属する抗原性の異なる D 型ウイルスが侵淫していることが明らかとなった。この日本株の独自性についての知見は、ワクチン開発におけるウイルス株選択の重要性を示している。今後は、日本における第 4 系統ウイルスの侵淫・流行状況を明らかにするためのさらなる疫学調査が必要であると考えられる。

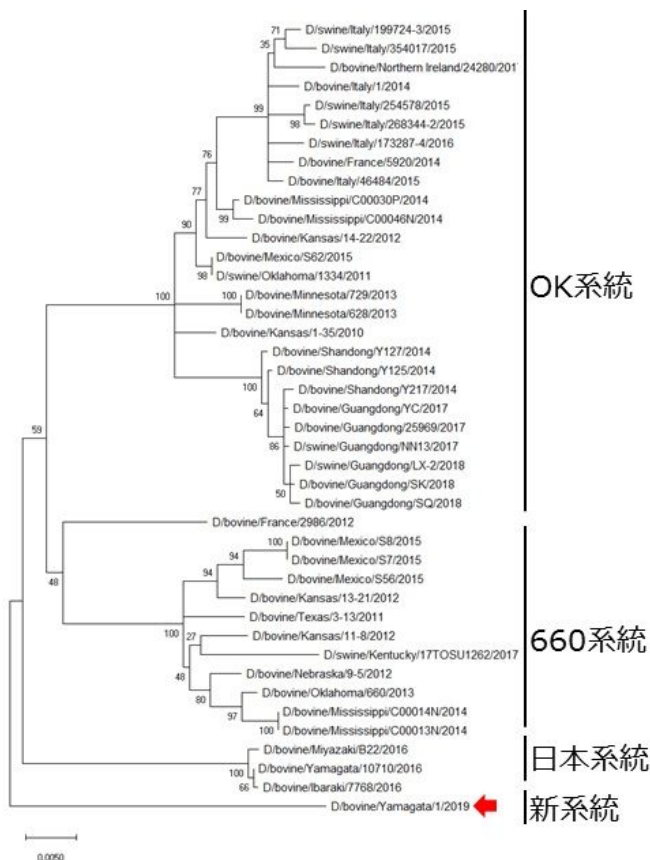


図 1 . D 型インフルエンザウイルスの HEF 遺伝子の進化系統樹解析

HEF 遺伝子分節の塩基配列をもとに作成しました。今回、検出・分離した赤矢印で示した分離株は、これまでの系統の株とは異なる独立した遺伝子位置を示しています。

## D 型インフルエンザウイルスリバーシジェネティクス法の開発

他の型のインフルエンザウイルスでは、感染性の変異ウイルスをプラスミドから人工的に構築できるリバーシジェネティクス法が確立しており、詳細な基礎研究に必須の解析技術として有効活用され、さらに、この技術を用いて作出された低温馴化弱毒変異ウイルスが、人のインフルエンザの生ワクチン株として実用化されている。そこで、D 型ウイルスのリバーシジェネティクス法の確立と最適化を目的とした。

インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス技術の開発には、ウイルスゲノム配列、特にウイルス RNA の転写・複製や RNA 分節の粒子への取り込みに重要な構造を形成するゲノム分節末端の塩基配列に関する正確な情報が必要である。そこでまず、D 型ウイルスのプロトタイプ株や日本株などのゲノム分節末端の塩基配列を独自に改変した RACE 法により調べたところ、いくつかのゲノム RNA 分節においては、すでに報告のある塩基配列とは最末端の塩基種が異なり、すべての塩基が U であることを発見した。次に、決定した正確な末端塩基配列を基に、ウイルスゲノム各 7 分節の cDNA を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により増幅し、RNA ポリメラーゼ I のプロモーター/ターミネーター配列をもつ RNA 転写用プラスミドに挿入した。加えて、ウイルスゲノムの転写・複製を司るウイルス RNA ポリメラーゼタンパク質(PB2, PB1, P3)や核タンパク質 NP を含むウイルスタンパク質の高度発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを HRT-18G 細胞に導入し、さらにその培養上清を ST 細胞に接種することで、感染性ウイルスの作出に成功した。しかし、その増殖性は野生型ウイルスより低かった。そこで、ウイルス粒子に取り込まれている各ゲノム分節 RNA 量をノーザンブロットで調べたところ、PB2、P3、NP 遺伝子がほとんど取り込まれてい

ないことがわかった。そこで、トランスフェクションするプラスミド量を最適化し、同様にウイルスを作製したところ、野生型ウイルスと同様な増殖性を示す感染性ウイルスの作製に成功した(図2)。さらに、この方法を用いることで、人為的な変異を導入した変異ウイルスが作出できることを明らかにした。

今回、私たちが確立した D 型インフルエンザウイルスの最適化したリバースジェネティクス技術は、任意のゲノム改変技術として、例えば、変異ウイルスを用いたウイルス増殖過程の解析や有効性の高いワクチンの開発に重要であるウイルス抗原性の解析などに活用できる。さらに、本技術は、呼吸器感染症である D 型インフルエンザのワクチン開発において、感染防御能をもつ粘膜炎抗体を誘導できる理想的な弱毒生ワクチン株の作出を可能にすることで、世界中で被害を及ぼしている BRDC の制御に大きく貢献することが期待される。

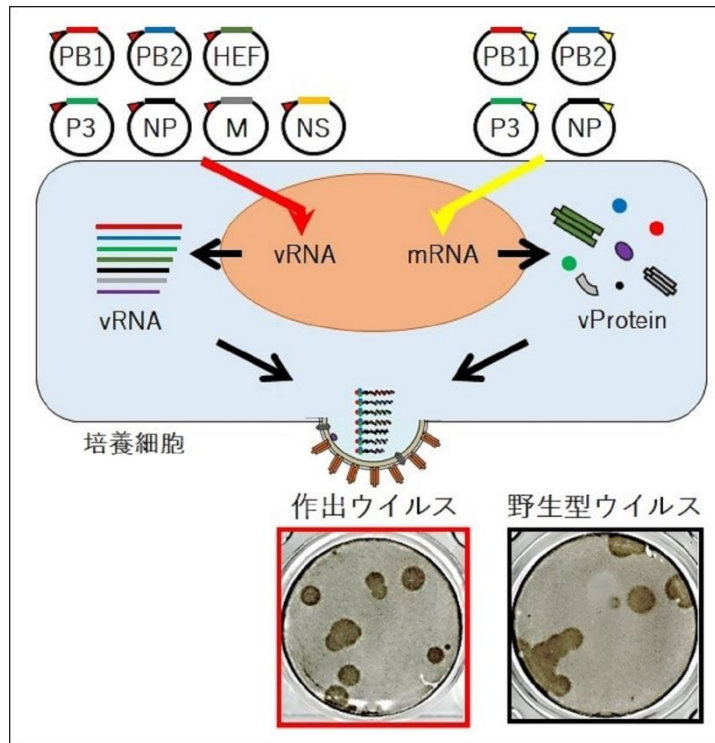


図2 D型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法

ウイルス RNA 分節を合成する 7 種類のプラスミドとウイルス RNA の転写・複製を司る 4 種類のウイルスタンパク質を発現するプラスミドを最適化した量比で同時に細胞にトランスフェクションすると、細胞の中で全てのウイルス RNA とタンパク質が作られ、その結果、感染性のウイルスが作出された。作出したウイルスは、野生型ウイルスと同等の細胞増殖性を示した。

### 8 分節改変ゲノムを持つ組換え D 型インフルエンザウイルスの作出

D 型ウイルスゲノムは 7 分節で構成される。このうち NS 分節にはスプライシング制御により 2 種類のタンパク質 (NS1 および NS2) がコードされている。研究が進んでいる A 型ウイルスの NS1 タンパク質は、宿主の自然免疫を抑制する多機能因子として宿主域や病原性を制御し、NS2 タンパク質はウイルス RNP の核外移行を担うことがわかっているが、D 型ウイルスの NS1 や NS2 タンパク質の機能はわかっていない。各タンパク質の機能解析には、それぞれに任意の変異を導入した変異ウイルスの表現型の変化を解析する手法が必要だが、NS1 と NS2 遺伝子間には N 末端の重複領域 (NOR: N-terminal overlapping domain) があるため NS 分節上で各タンパク質に特異的な変異を導入することは不可能です。そこで、スプライシング配列の改変により NS1 のみを発現する NS1 分節とイントロン配列の欠損変異により NS2 のみを発現する NS2 分節を同時にもつ 8 分節ウイルスを作出しました(図 3: rD/OK-8seg)。

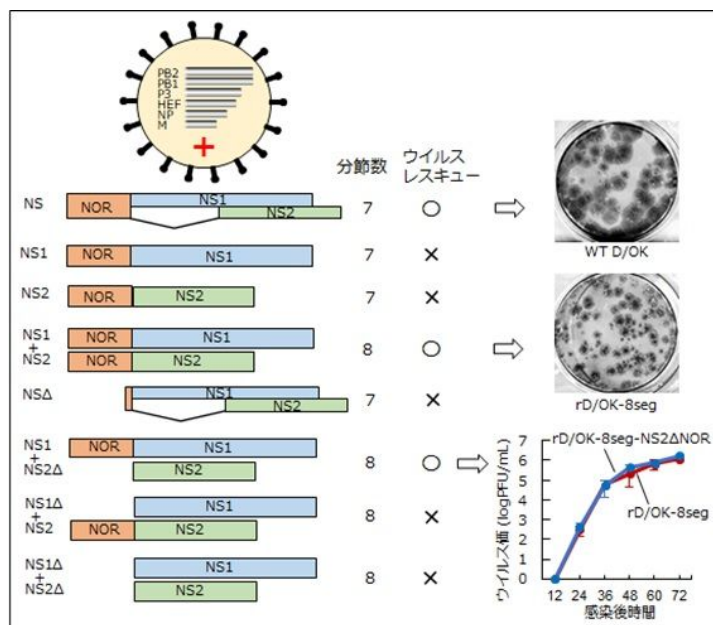


図3 8分節ゲノムをもつ組換え D 型ウイルス

人工 NS1 分節と NS2 分節をもつ 8 分節ウイルス (rD/OK-8seg) を作出した。加えて、NS2 の NOR を欠損する 8 分節ウイルス (rD/OK-8seg-NS2 NOR) もレスキューされた。NS1 の NOR を欠損する 8 分節ウイルスはレスキュー出来なかった。

さらに、各分節の NOR を欠損させた 8 分節変異ウイルス



のレスキューの成否から、NS1 タンパク質の NOR はウイルス増殖に必須の機能をもつことがわかった。

今回、確立した D 型インフルエンザウイルスの 8 分節レスキューシステムは、NS1 や NS2 タンパク質のみならず、M 分節に同様にコードされる 2 つのタンパク質 (M1 および M2) の分子解析にも応用できると考えられる。さらに、8 分節ウイルスは弱毒化すること、またそのゲノム構造から強毒復帰する可能性は極めて低いため、D 型インフルエンザのワクチン開発への応用も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ishida Hiroho, Murakami Shin, Kamiki Haruhiko, Matsugo Hiromichi, Takenaka-Uema Akiko, Horimoto Taisuke	4. 巻 94
2. 論文標題 Establishment of a Reverse Genetics System for Influenza D Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01767-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01767-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Shin, Sato Ryota, Ishida Hiroho, Katayama Misa, Takenaka-Uema Akiko, Horimoto Taisuke	4. 巻 26
2. 論文標題 Influenza D Virus of New Phylogenetic Lineage, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 168 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2601.191092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 ODAGIRI Tomoha, ISHIDA Hiroho, LI Jun-You, ENDO Maiko, KOBAYASHI Tomoya, KAMIKI Haruhiko, MATSUGO Hiromichi, TAKENAKA-UEMA Akiko, MURAKAMI Shin, HORIMOTO Taisuke	4. 巻 80
2. 論文標題 Antigenic heterogeneity among phylogenetic clusters of influenza D viruses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 村上 晋, 堀本 泰介	4. 巻 65
2. 論文標題 新しいウシ呼吸器病の原因ウイルス : D型インフルエンザウイルス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 家畜診療	6. 最初と最後の頁 347-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村上 晋	4. 巻 71
2. 論文標題 日本のD型インフルエンザ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JVM	6. 最初と最後の頁 405-413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsu Sumiho, Murakami Shin, Shindo Keiko, Horimoto Taisuke, Sagara Hiroshi, Noda Takeshi, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 92
2. 論文標題 Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02084 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02084-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 村上晋、堀本泰介	4. 巻 67
2. 論文標題 新しいD型インフルエンザウイルス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 161-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wan Xiu-Feng, Ferguson Lucas, Oliva Justine, Rubrum Adam, Eckard Laura, Zhang Xiaojian, Woolums Amelia R., Lion Adrien, Meyer Gilles, Murakami Shin, Ma Wenjun, Horimoto Taisuke, Webby Richard, Ducatez Mariette F., Epperson William	4. 巻 94
2. 論文標題 Limited Cross-Protection Provided by Prior Infection Contributes to High Prevalence of Influenza D Viruses in Cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00240-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00240-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上晋、佐藤遼太、石田大歩、上間亜希子、堀本泰介
2. 発表標題 新しい遺伝学系統のD型インフルエンザウイルスの分離
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上晋、佐藤遼太、石田大歩、上間亜希子、堀本泰介
2. 発表標題 新しい遺伝学系統のD型インフルエンザウイルスの分離
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田大歩、神木春彦、松郷宙倫、上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 リバースジェネティクス法で作出したD型インフルエンザウイルス粒子内に取り込まれるゲノムRNAの解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田大歩、神木春彦、松郷宙倫、上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 リバースジェネティクス法で作出したインフルエンザDウイルス粒子内に取り込まれるゲノムRNAの解析
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 石田大歩、神木春彦、松郷宙倫、上間亜希子、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 D型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法の開発
3. 学会等名 第33回インフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 大歩、神木 春彦、松郷 宙倫、小林 知也、上間 亜希子、村上 晋、堀本 泰介
2. 発表標題 D型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法の開発
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroho Ishida, Haruhiko Kamiki, Hiromichi Matsugo, Tomoya Kobayashi-Kitamanura, Akiko Takenaka-Uema, Shin Murakami, Taisuke Horimoto
2. 発表標題 Development of a reverse genetics system for influenza D virus
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroho Ishida, Haruhiko Kamiki, Hiromichi Matsugo, Tomoya Kobayashi-Kitamanura, Akiko Takenaka-Uema, Shin Murakami, Taisuke Horimoto
2. 発表標題 A reverse genetics system for influenza D virus
3. 学会等名 The 10th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上晋
2. 発表標題 D型インフルエンザウイルスとウシ呼吸器病
3. 学会等名 平成30年度家畜伝染病等危機管理対策強化講習会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 日本のD型インフルエンザ
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小田切友葉、石田大歩、李俊祐、遠藤麻衣子、上間亜希子、芳賀猛、増田恒幸、大森崇史、田積晃浩、平修、笹川千尋、山中隆史、村上晋、堀本泰介
2. 発表標題 ウシにおけるD型インフルエンザウイルス抗体保有状況の調査
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin Murakami, Tomoha Odagiri, Hiroho Ishida, Tomoya Kobayashi, Akiko Takenaka-Uema, Takeshi Haga, Taisuke Horimoto
2. 発表標題 Antigenic characterization of influenza D virus
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoha Odagiri, Hiroho Ishida, Junyou Li, Maiko, Endo, Akiko Uema, Takeshi Haga, Tsuneyuki Masuda, Takashi Ohmori, Akihiro Tazumi, Osamu Taira, Chihiro Sasakawa, Takashi Yamanaka, Shin Murakami, Taisuke Horimoto
2. 発表標題 Sero-surveillance of influenza D virus infection in cattle
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------