

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05974

研究課題名(和文) 経済的被害をもたらす子豚の呼吸器病ウイルスによる鼻咽腔および肺の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of nasopharynx and lung caused by respiratory disease virus in pigs

研究代表者

平井 卓哉 (Hirai, Takuya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60321668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：宮崎県の養豚場において、子豚から豚インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm09)が検出された。これらの豚は呼吸器症状を示さず、不顕性感染と考えられた。鼻咽腔関連リンパ組織(NALT)を覆う上皮はCK-18抗体に陽性を示し、M細胞の存在が示唆された。また、インフルエンザウイルスの受容体である(2-6)型シアル酸が、(2-3)型より多いことが明らかになった。一部の上皮細胞はCK-18と(2-6)型シアル酸と両方に陽性を示すため、M細胞は(2-6)型シアル酸を有することが示唆された。NALT内のマクロファージはインフルエンザ抗原陽性を示し、M細胞を介して取り込まれた可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器病対策は養豚業界の重要な課題である。呼吸器病ウイルスの侵入門戸は鼻咽腔であるが、同部の病態解析が進展していない。本研究は、同部におけるウイルス動態を明らかにすることを目的としている。鼻咽腔関連リンパ組織(NALT)を覆う上皮の一部はCK-18抗体に陽性を示し、豚においてもM細胞の存在が示唆された。また、M細胞は(2-6)型シアル酸を有することが示された。NALT内のマクロファージはインフルエンザ抗原陽性を示し、M細胞を介して取り込まれた可能性が考えられた。鼻咽腔におけるウイルス動態の研究は、粘膜ワクチン開発の基礎となり、学術的および社会的意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：Swine influenza virus (A/H1N1pdm09) were detected in the piglets of the local pig farm in Miyazaki prefecture. Subclinical infection was considered because these piglets did not show respiratory sign. CK-18 immunohistochemistry demonstrated M cells in the epithelial cells covering nasal-associated lymphoid tissue (NALT). In addition, lectin histochemistry revealed that the number of 2,6-linked sialic acid is more than 2,3-linked sialic acid in the epithelial cells of NALT. Several epithelial cells show double positive for both CK-18 immunohistochemistry and 2,6-linked sialic acid lectin histochemistry. Influenza positive macrophages were also detected in the NALT. These results suggest that M cells express 2,6-linked sialic acid, and influenza virus transported by M cells may be engulfed by macrophages or dendritic cells.

研究分野：獣医病理学

キーワード：豚 PRRS 豚インフルエンザ 病理 病態解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患は子豚の死因の中で最も多く、生存しても豚は削瘦や発育不良に陥るため、飼育成績悪化の大きな要因になる。豚の呼吸器複合感染症の推定損失額は年間 280 億円と報告されており、呼吸器病の対策は最も重要な課題である。豚の呼吸器複合感染症は、PRRS ウイルスをはじめ、豚インフルエンザウイルス、豚呼吸器コロナウイルス等のウイルスの他、各種細菌の重感染により重篤な病態を引き起こす。本症は PRRS ウイルスが主となり、上記の複数の病原体が複雑に関与して肺病変を形成する。PRRS は経鼻感染後、感染局所のマクロファージで増殖し、ウイルス血症により肺に到達して、間質性肺炎を引き起こす。一方、豚インフルエンザウイルスは呼吸器粘膜の上皮細胞に感染して上皮バリアを障害し、他病原体の感染増加に深く関与する。

マウス等の鼻咽腔には鼻咽腔関連リンパ組織(NALT)が存在し、感染初期における生体防御に重要な役割を担っていると考えられる。申請者は豚にも NALT が存在することを明らかにした。豚呼吸器病の病理発生機序の理解と予防対策の確立のためには、呼吸器病ウイルスの侵入門戸である上部呼吸粘膜における病原性ウイルスの増殖性や病態を理解することが不可欠である。養豚業界において豚の呼吸器複合感染症が最重要課題になっているにも関わらず、NALT を含む鼻咽腔の病態解析が全く進展していない。その背景として、国内外に豚病に関する病理学者が少ないこと、NALT の存在があまり知られていないこと、鼻咽腔が頭蓋骨に囲まれた部位に存在し、採材に解剖学的知識や技術が伴うことが挙げられる。

2. 研究の目的

PRRS ウイルスは主に経鼻感染し、同部で増殖していると推測される。豚呼吸器複合感染症における豚インフルエンザウイルス感染の重要性については病理学的解析がほとんどなされていない。本研究では初感染部位である豚の鼻咽腔病変を病理学的に解析することを目的とし、同部における病態形成メカニズムを理解する上で新たな知見を提供できる。

3. 研究の方法

複数の農場から 40~90 日齢の死亡豚を入手し、鼻腔スワブを採取する。NALT はホルマリン固定後にパラフィン包埋する。鼻腔スワブの RT-PCR にてウイルス陽性症例のみ選出し、鼻咽腔病変を病理組織学的に解析する。また、ウイルスのレセプター分布を免疫組織化学的手法により明らかにする。さらに、ウイルスレセプターの分布およびウイルス感染細胞の局在と鼻咽腔病変との関連性まで調べる。豚インフルエンザウイルスの分離材料には鼻腔スワブおよび肺乳剤を用いる。これらを発育鶏卵の羊膜腔内に接種し、約 48 時間培養する。羊水を採取し、型・亜型特異的 RT-PCR 法およびシーケンス解析を行い、遺伝子性状まで明らかにする。

豚インフルエンザ感染豚から分離されたウイルスをマウスへ実験的に感染させ、本ウイルスによる呼吸器病変の病理学的解析を行い、実験例と野外例の病態を比較・検討する。本実験において感染実験前に上記ウイルスのマウスへの馴化を行う。馴化株作製には、マウスで継代を 18 代実施する。馴化ウイルスを用いた実験では、接種したマウスを接種後 3 日、5 日、7 日に剖検し、それらの病変を検索する。また、馴化前の元株ウイルスについても同様の実験を行う。

4. 研究成果

宮崎県内の母豚規模約 500 頭の繁殖 1 農場において、豚インフルエンザウイルスおよび PRRS ウイルス感染の実態調査を行った。8 月~11 月にかけて、子豚（5~11 週齢）の口腔液もしくは

鼻腔スワブを2週間ごとに採材し、RT-PCRもしくはインフルエンザ検出キットを用いて豚インフルエンザウイルスの検出を行った。104 検体中インフルエンザ陽性検体数は10 検体であった。これらの内訳は、8月に3 検体、9月に4 検体、10月に1 検体、11月に2 検体であり、毎月検出された。10 検体中2 検体がPRRS ウイルスも陽性であった。また、10 検体中3 検体で豚インフルエンザウイルスが分離された。これらのウイルス亜型はH1N1であった。その他に県内の他農場で鼻腔スワブ2 検体より豚インフルエンザウイルスが分離され、その亜型はH1N1であった。

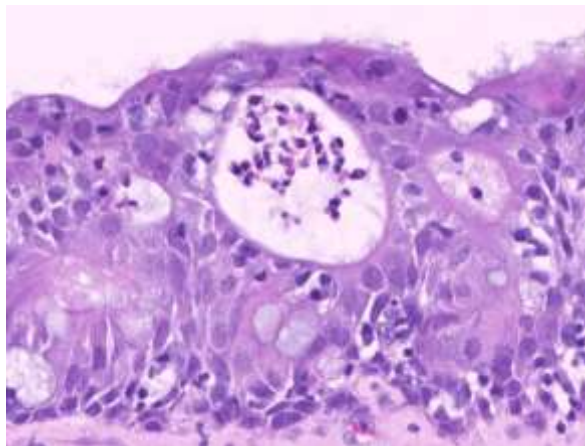


図1 鼻咽腔の HE 染色を示す。炎症細胞の浸潤が認められる。

前記の繁殖農場において11月に臍ヘルニアや歩行異常を示す豚6頭を剖検したところ、1頭の鼻腔スワブで豚インフルエンザが検出された。本例には鼻咽腔炎(図1)、気管炎、気管支間質性肺炎が認められ、細菌感染による病変は軽度であった。免疫組織学的検査にて鼻咽腔上皮(図2)、気管上皮、気管支上皮にウイルス抗原が検出された。このウイルスはA/H1N1pdm09に分類された。本例は、PRRS ウイルス陰性であった。今回の症例は明らかな呼吸器症状を示しておらず、不顕性感染と考えられた。

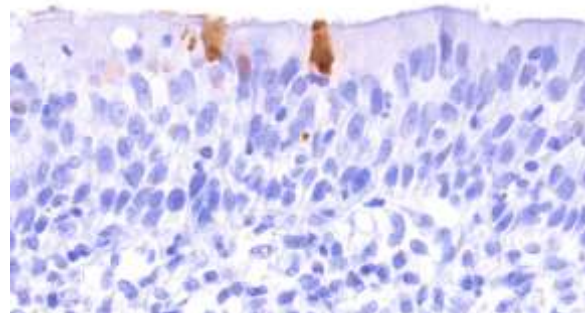


図2 鼻咽腔のインフルエンザ抗体を用いた免疫組織化学染色を示す。

この豚より分離された豚インフルエンザウイルスをマウスへ実験的に感染させ、実験例と野外例の病態を比較・検討した。馴化ウイルス感染マウスには、肺胞領域に及ぶ重度かつ広範囲な病変形成および抗原分布が示され、肺組織でより高いウイルス量が検出された。一方、馴化前の元株ウイルス感染マウスの肺において、豚インフルエンザ感染豚(剖検例)の肺と類似する軽度の壊死性気管支間質性肺を誘発し、そのウイルス抗原分布は病変部、すなわち気管支上皮細胞および一部の肺胞上皮細胞に限られていた。マウスにおいて形成された気管支肺炎が継代により増悪したことから、豚においてもヒト由来ウイルスが侵入し継続的に感染を繰り返した場合、ウイルスの増殖率が上昇し、肺病変が増悪する可能性が示唆された。

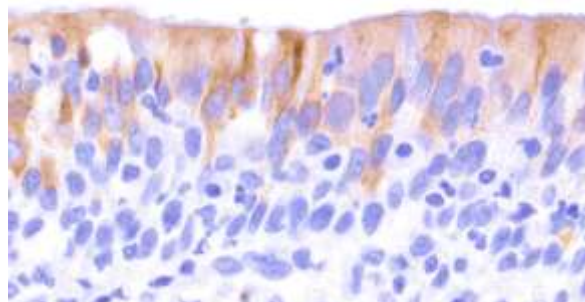


図3 鼻咽腔の CK-18 抗体を用いた免疫組織化学染色を示す。

NALT を覆う上皮層は特殊に分化しており、そこには外来抗原の取り込みを専門に行う Microfold 細胞 (M 細胞) が存在し、外来抗原は上皮直下に存在するマクロファージ

と樹状細胞に受け渡される。豚の M 細胞のマーカーである CK-18 抗体を用いた免疫組織化学染色で、NALT を覆う上皮に陽性所見（図 3）が得られ、豚にも M 細胞の存在が示唆された。インフルエンザウイルスの糖鎖レセプターである $\alpha(2-3)$ と $\alpha(2-6)$ シアル酸を認識する植物レクチン（MAM と SNA レクチン）を用いた染色で、豚の NALT を覆う上皮には SNA レクチンに対し陽性を示す上皮細胞が多いことが示された（図 4）。連続標本を作製して解析すると、同一細胞は CK-18 抗体と SNA レクチンの両方に陽性を示すことから、M 細胞は $\alpha(2-6)$ シアル酸を有することが示唆された。さらに、NALT 内の一部のマクロファージはインフルエンザ抗原陽性を示し、M 細胞を介して取り込まれた可能性が示唆された。

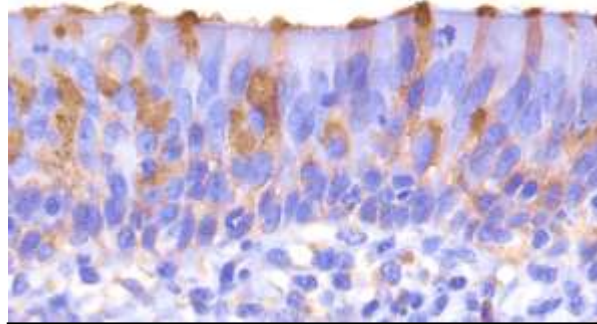


図 4 鼻咽腔の SNA レクチン染色を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	目堅 博久 (Mekata Hirohisa) (90633264)	宮崎大学・キャリアマネジメント推進機構・助教 (17601)	

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