

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780275

研究課題名（和文）

高病原性鳥インフルエンザ感受性に果たす宿主サイトカイン応答の役割

研究課題名（英文）

Role of host cytokine response against highly pathogenic avian Influenza virus infection

研究代表者

笛吹 達史（USUI TATSUFUMI）

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：80508482

研究成果の概要（和文）：高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）感染症における宿主の病態と免疫応答とを解析するため、リアルタイム PCR 法を用いて、ニワトリおよびウズラの免疫関連遺伝子の発現量を測定した。致死的な HPAIV 攻撃に対してわずかに抵抗性を示したウズラ群では、感染 24 時間後の末梢血単核球で高い IFN- $\gamma$  誘導が認められた。一方、2009 年に日本のウズラ農場で分離された H7N6 亜型ウイルスのウズラおよびニワトリ脳継代により、ウズラに致死的な病原性株を得た。

研究成果の概要（英文）：Expression of immune-related genes was evaluated in highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV)-infected chicken and quail using quantitative real-time PCR. Against a lethal dose of HPAIV challenge, quails whose PBMC induced higher level of IFN- $\gamma$  mRNA at 24 hours post challenge showed a slightly longer mean death time and a delayed viral shedding from cloaca compared to chicken. In addition, we obtained the H7N6 virus with high pathogenic form of HA cleavage site by intracerebral passage of low pathogenic H7N6 virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス、サイトカイン、インターフェロン、インターロイキン、H5N1 亜型、H7N6 亜型

## 1. 研究開始当初の背景

2008 年 4 月から 5 月にかけて、青森県、秋田県、北海道で衰弱したオオハクチョウあるいはその斃死体から相次いで H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）が分離された。現在もアジアを中心にヨーロッパ、アフリカへと広く分布する

H5N1 亜型 HPAIV は、1996 年に中国広東省のガチョウから分離された H5N1 亜型ウイルスから派生したものと考えられている。これまで、H5N1 亜型 HPAIV はニワトリに対して高い致死性を示すが、自然宿主であるマガモなど野生水禽類に対しては病原性を示さないものと考えられてきた。しかし、2005 年に、中国の青海湖で HA clade 2.2 に属する

H5N1 亜型ウイルス感染によって野生水禽類の大量死が起きたことで、病原性の変化した H5N1 亜型ウイルスの出現が指摘されている。

日本の養鶏場における高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の発生は、2004 年と 2007 年にそれぞれ HA clade 2.5 と 2.2 に属する H5N1 亜型ウイルスによって起こった。2008 年には、オオハクチョウ分離株と同じ HA clade 2.3.2 ウイルスによる HPAI は発生しなかったが、渡り鳥による国外からのウイルス侵入、野生水禽から家禽へのウイルスの伝播の可能性に対して永続的に警戒しつづけなければならない。事実、本研究期間中の 2010 年から 2011 年にかけて、おそらく渡り鳥の移動に伴い、再び HA clade 2.3.2 ウイルスが国内に侵入し、日本全国の死亡野鳥や養鶏場で H5N1 亜型ウイルスが次々と分離される事態となった。

HPAI 制圧のためには、野生水禽から家禽、人社会までを包括する HPAIV の動態の理解が欠かせない。とくに、水禽類に致死性を示すウイルスの出現のような、鳥類の H5N1 ウイルスに対する感受性に関わる変化が、環境中のウイルス動態に与える影響は大きい。そこで HPAIV の動態への理解を深めるため、ニワトリやアヒルなどの家禽に加え、野生水禽類を含む幅広い鳥種を対象に HPAIV 感受性のメカニズムを明らかにすることが重要である。

本研究では、主要な家禽であるニワトリと、インフルエンザウイルスに高い感受性を示すと言われている同じく家禽のウズラを対象に、近年分離された HPAIV に対する感受性について検討することにした。HPAI の病態に関与するであろう宿主因子として、免疫機能を調節するサイトカイン発現に着目し、鳥の HPAIV 感受性に果たすサイトカイン応答の重要性について検討する。

また、本研究の開始時期に重なるように、2009 年に愛知県のウズラ農場で H7N6 亜型ウイルスによる鳥インフルエンザが発生した。分離された H7N6 亜型ウイルスは低病原性株であったが、病原性のない H7 亜型ウイルスが家禽で維持される間に強毒化する可能性が指摘されている。H7 亜型ウイルスの強毒化メカニズムを解明することは、鳥類の HPAIV 感受性メカニズムを明らかにすることにも密接に関わることから、本研究での利用にむけ、高病原性 H7 亜型ウイルスの作出も同時に試みることにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、HPAIV 感染に対する鳥類宿主の免疫応答の解析を通じて、鳥種間で見られる病態の違いやウイルスの病原性の違いに関わる宿主要因を解明するため、以下の 3 つを具体的な目的とした。

(1) リアルタイム PCR 法によるウズラ免疫関連遺伝子 mRNA 定量系の構築

(2) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリおよびウズラにおける免疫関連遺伝子発現動態の解析

(3) H7 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスの継代による強毒型ウイルスの作出

## 3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR 法によるウズラ免疫関連遺伝子 mRNA 定量系の構築

①ウズラ免疫関連遺伝子の塩基配列の決定

ウズラ成鳥より脾臓を採取し、密度勾配遠心法にて脾細胞を調製した。ウズラ脾細胞を Concanavalin A (ConA) 5µg/ml を添加した RPMI1640 培地にて刺激培養した後、全 RNA を抽出、濃度測定後、逆転写反応を行って cDNA を合成した。既報のニワトリ免疫関連遺伝子の塩基配列をもとに、IL-18、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-13、IL-18 及び TLR-7 に特異的なプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて、ウズラ脾細胞由来 cDNA を鋳型に PCR を行い、得られた増幅産物の塩基配列を決定した。ニワトリ遺伝子との相同性を確認後、ウズラ免疫関連遺伝子の塩基配列としてデータベースに登録した。

②ウズラ免疫関連遺伝子定量のためのリアルタイム PCR 法の構築

決定したウズラ免疫関連遺伝子および既報のウズラ IL-2、IFN-α および IFN-γ 遺伝子の塩基配列からリアルタイム PCR 用プライマーを設計した。ウズラ脾細胞由来 cDNA を鋳型に、SYBR Green I によるインターカレーター方式のリアルタイム PCR を行い、アニーリング温度など反応条件の検討と、融解曲線分析による特異性の確認を行った。

定量用の標準試料を調製するため、リアルタイム PCR 産物を pGEM-T ベクターに挿入し、大腸菌に形質導入して増幅した標準プラスミドをベクター配列の一カ所で切断する制限酵素で処理した後、DNA 濃度と推定分子量から単位濃度当たりの遺伝子コピー数を計測した。これを各遺伝子用の濃度既知の標準試料とした。

(2) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリおよびウズラにおける免疫関連遺伝子発現動態の解析

6 週齢のニワトリ及びウズラに A/whooper swan/Aomori/1/2008 (青森株) または A/tundra swan/Tottori/12-002/2010 (鳥取株) を  $10^6$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml ずつ経鼻接種した。接種後 8 時間毎に臨床徴候を観察し、24 時間毎に咽喉頭およびクロアカスワブ試料を、10,000 単位ペニシリンと 10 mg ストレプトマイシンを含む普通ブイヨン 1 ml に採取し

た。接種 56 時間後にはニワトリ 3 羽、72 時間後にはウズラ 3 羽から、それぞれ脳、肺、気管、脾臓、腎臓、肝臓、大腸を採取しウイルス力価を測定した。

また、接種 24 時間後の末梢血単核球 (PBMC) を分離し、ConA で 3 時間の刺激培養を行った後、リアルタイム PCR 法を用いて、ウズラおよびニワトリ IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-13、IL-18 および TLR7 遺伝子の mRNA 発現量を測定した。インフルエンザウイルス M 遺伝子についてもリアルタイム PCR による定量を行った。

### (3) H7 亜型低病原性ウイルスの継代による強毒型ウイルスの作出

軽度に麻酔をかけたウズラ成鳥あるいはニワトリ初生ヒナの脳腔内にウイルス液を 0.025~0.05 ml 接種し、4~5 日間観察後に脳乳剤を調製、発育鶏卵を用いてウイルス力価を測定した。脳乳剤からウイルス RNA を抽出し、逆転写、HA 開裂部位を増幅して塩基配列を決定した。最終的に得た継代株について全塩基配列を決定して継代開始前のウズラ分離株と比較するとともに、1 週齢ニワトリ、5 週齢ニワトリおよび 5 週齢ウズラへの経鼻接種による病原性を評価した。国際獣疫事務局(OIE)の策定した国際基準による病原性判定は、4 週齢ニワトリ 8 羽を用いて静脈内接種試験により行った。

## 4. 研究成果

### (1) リアルタイム PCR 法によるウズラ免疫関連遺伝子の mRNA 定量系の構築

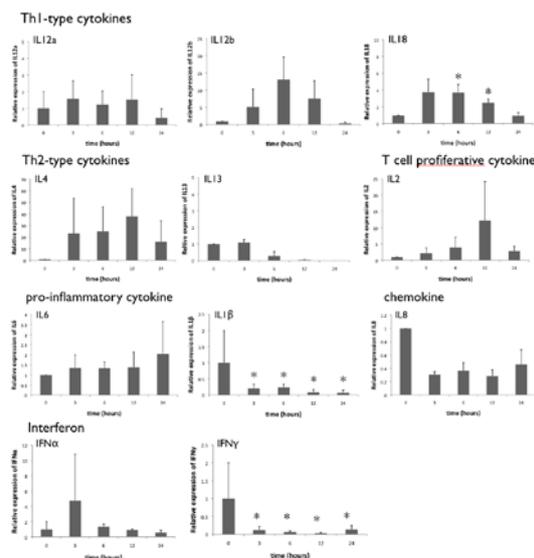


図 1 ウズラ脾細胞における ConA 刺激培養による免疫関連遺伝子の発現動態

構築したウズラ IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-18、IL-2、

IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p35、IL-12p40、IL-13、IL-18 及び TLR-7 遺伝子の発現定量系を用いて、ConA 刺激したウズラ脾細胞における免疫関連遺伝子の発現動態を解析した (図 1)。

### (2) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリおよびウズラにおける免疫関連遺伝子発現動態の解析

青森株および鳥取株を経鼻接種したニワトリ群のほぼ全羽が接種後 48 時間から沈鬱状態となり、72 時間までに特徴的な徴候を示すことなく死亡した。一方、ウズラは、両株接種群ともに接種後 48 時間から 72 時間で沈鬱状態となり、発症後 24 時間以内に神経症状を呈し全羽が死亡した。このときの各群の平均致死時間は、青森株接種ニワトリ群が  $66.0 \pm 4.0$  時間、鳥取株接種ニワトリ群が  $72.0 \pm 17.3$  時間、青森株接種ウズラ群が  $91.2 \pm 4.4$  時間、鳥取株接種ウズラ群が  $78.4 \pm 3.6$  時間と、両株ともにウズラが長く生存した。とくに青森株接種ウズラ群の平均致死時間はニワトリ群よりも有意に長かった。鳥取株については、ニワトリ群内での個体差が大きくウズラ群との間に違いは認めなかった。

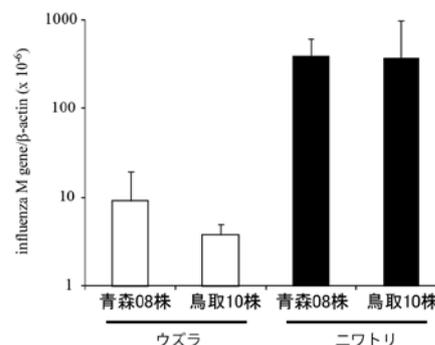


図 2 接種 24 時間後の末梢血単核球中のウイルス由来 RNA 量

青森株接種ニワトリ群とウズラ群の全羽で、接種 24 時間以降、咽喉頭からのウイルス排出を認めた。一方、クアカからのウイルス排出を認めた個体数は、ニワトリ群が 24 時間後で 4/4 羽であったのに対し、ウズラ群では 1/11 羽と少なく、48 時間後に全羽が陽性となった。接種 24 時間後の PBMC におけるウイルス RNA 量はニワトリ群よりウズラ群で顕著に低く (図 2)、感染後のウイルス増殖と全身への分布がウズラではわずかに遅いことが推察された。

接種 24 時間後の PBMC における免疫関連遺伝子の発現誘導を比較したところ、青森株接種群及び鳥取株接種群ともに、ウズラにおいて有意な IFN- $\gamma$  発現誘導が認められた。

死亡直前のウズラ (接種後 72 時間) およ

びニワトリ（接種後 56 時間）では、検索した全ての主要臓器からウイルスが分離された。全体的にウイルス感染価はウズラ臓器で高い傾向が認められたが、中でもウズラの脳で高いウイルス力価が認められた（図 3）。

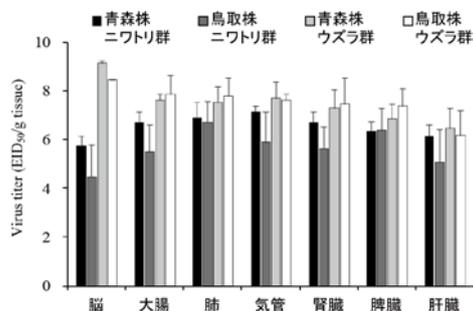


図 3 死亡前のニワトリおよびウズラの臓器別ウイルス感染価

ウズラは、ニワトリと同様に H5N1 亜型 HPAIV 感染に対し高い致死性を示すが、ニワトリに比べ、致死時間及び発症に要する時間が長く、発症前にも多くのウイルスを排出する可能性があり、防疫上、注意を要することが示された。大きな違いではなかったものの、致死時間の延長やウイルス排出の遅延には、感染直後の IFN- $\gamma$  応答が関与した可能性が考えられる。

### (3) H7 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスの継代による強毒型ウイルスの作出

H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスをウズラ脳で 16 代、次いでニワトリ初生ヒナ脳で 4 代継代を行った。ウズラ脳 9 継代目以降、HA 開裂部位に 1 個のアルギニンの挿入 (K-R-R-R) が認められ、ウズラ脳 16 継代後、ニワトリ初生ヒナ脳で継代したウイルスにはさらなるアルギニンの挿入 (K-R-R-R-R) が認められた。得られた継代株 (K-R-R-R-R) では M2 蛋白及び PA 蛋白にもそれぞれ一個のアミノ酸置換が認められた。

表 1. H7N6 ウイルス継代によるアミノ酸変異

継代歴		HA開裂部位	PA[490位]	M2[44位]
ウズラ脳	ニワトリ脳			
0代 (分離株)	Qb0	PEIP KRR *G	R	D (アスパラギン酸)
:	:			
9代	Qb9	PEIP KRRR *G	R	D
10代	Qb10	PEIP KRRR *G	K	D
:	:			
16代	Qb16	PEIP KRRR *G	K	D
16代 + 1代	Qb16/Cb1	PEIP KRRR *G	K	D
:	:			
16代 + 3代	Qb16/Cb3	PEIP KRRR *G	K	N (アスパラギン)
16代 + 4代	Qb16/Cb4	PEIP KRRR *G	K	N

4 週齢ニワトリを用いた静脈内接種試験の

結果、得られた継代株 (K-R-R-R-R) は低病原性であった。しかし、継代株 (K-R-R-R-R) を経鼻接種した 1 週齢ニワトリでは、2 羽中 2 羽が接種 7 日目に神経症状を呈した後に死亡し、死亡時の脳からはウイルスが分離された。同様に、継代株 (K-R-R-R-R) を経鼻接種した 5 週齢ウズラ 2 羽中 2 羽が接種 8 日目に死亡し、死亡時の脳からウイルスが分離された。5 週齢ニワトリは無徴候のまま耐過したが、その間、咽喉頭及びクロアカからのウイルス排出が検出された。分離直後の株は、4~5 週齢のニワトリに経鼻接種しても感染が成立しにくく、ニワトリでは増殖しにくい性状であったことから、継代による変異の結果、ニワトリへの感染性が上昇したものと考えられる。

2009 年にウズラから分離された低病原性 H7N6 亜型ウイルスが、ウズラやニワトリ群内で維持される間に病原性が増強するリスクが示唆された。本継代株は、鳥種や週齢の違いにより、異なる病態を呈することから、H7 亜型ウイルスの病原性と宿主因子の解析に有用である。

### 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)

[学会発表] (計 7 件)

- ①宇野有紀子、「日本国内で 2008 年と 2010 年に分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染におけるウズラの病態」、第 153 回日本獣医学会学術集会、大宮ソニックシティ (埼玉)、2012 年 3 月 27 日
- ②笹吹達史、「ウズラ由来低病原性 H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスのウズラ及び鶏脳継代による HA 開裂部位への塩基性アミノ酸の挿入と病原性の変化」、First Negative Strand Virus-Japan Symposium、ハウステンボス (長崎)、2012 年 1 月 22 日
- ③Yukiko Uno、「Immune Response of Quails against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated in 2008 and 2010」、The 8th International AFAS Joint Symposium between Japan and Korea、米子コンベンションセンター (鳥取)、2011 年 11 月 16 日
- ④笹吹達史、「ウズラ由来低病原性 H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスのウズラ及び鶏脳継代による HA 開裂部位へのアミノ酸挿入と病原性の変化」、第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪府立大学 (大阪)、2011 年 9 月 20 日

- ⑤ Tatsufumi Usui, Pathogenic potential of H7N6 subtype Avian Influenza Virus isolated from Quail, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan  
2011年9月15日
- ⑥ 笛吹達史、「ウズラ由来H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスのウズラおよびニワトリ脳継代によるHA開裂部位へのアミノ酸挿入と脳内における増殖性の獲得」、第26回中国四国ウイルス研究会、徳島大学（徳島）、2011年6月18日
- ⑦ 宇野有紀子、「ウズラ免疫関連遺伝子の発現解析を目的としたreal-time PCR法によるmRNA定量系の構築」、第149回日本獣医学会学術集会、日本獣医生命科学大学（東京）、2010年3月26日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笛吹 達史 (USUI TATSUFUMI)  
鳥取大学・農学部・講師  
研究者番号：80508482

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し