

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780311

研究課題名(和文) 鳥インフルエンザウイルスの豚での増殖能を決定する要因の探索

研究課題名(英文) Investigation of factors affecting growth ability of avian influenza viruses in pigs

研究代表者

竹前 喜洋 (Nobuhiro, Takemae)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター・主任研究員

研究者番号：10584386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：豚は鳥由来のA型インフルエンザウイルスに感受性があるが、野鳥から豚への感染は一過性で終わる場合と野鳥ウイルスが豚で長期間循環する場合とがある。こうした鳥ウイルスの豚での増殖性の違いが、何に起因するのかわからない。本研究では、豚と鳥の宿主体温の違いに着目し、野鳥ウイルスを豚細胞で低温順化させた場合に起こる変化を調べた。遺伝子解析の結果、低温順化ウイルスのポリメラーゼ複合体を構成する遺伝子やHA遺伝子に非同義置換が起きていることを見出した。本成果により、鳥ウイルスの豚での増殖能獲得にポリメラーゼ活性やHA蛋白の関与が推定された。

研究成果の概要(英文)：Pigs are susceptible to type A influenza viruses of avian origin. However, influenza viruses transmitted from wild birds to pigs in nature were not always maintained in pig populations for long time. Adaptation of avian viruses to pigs may require acclimation to low temperature. Temperatures of intestinal tract in aquatic birds and upper respiratory tract in pigs where influenza viruses initiate replication are about 41 and 37 degrees C, respectively. To identify factors affecting the growth ability of avian viruses in pigs, avian viruses were repeatedly infected at low temperature to epithelial cells isolated from porcine lung. Comparative sequence analysis showed that several non-synonymous substitutions in the genes constituting of ribonucleoprotein complex and HA genes were occurred in the low-temperature adapted avian viruses. These observations suggested a possibility that the polymerase activity and HA protein could affect the growth ability of avian influenza virus in pigs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学

キーワード：インフルエンザ 豚 鳥 温度感受性 宿主特異性

1. 研究開始当初の背景

(1) A型インフルエンザウイルスの自然宿主は水禽類などの野鳥であり、自然界においては、野鳥から哺乳類への直接感染は通常は起こらない。新しい宿主に適應するには宿主細胞内での増殖能の獲得が必要となるためである。一方で、豚の呼吸器の上皮細胞表面には、人型ウイルスのレセプターとなるガラクトースに 2,6 結合したシアル酸と鳥型ウイルスのレセプターとなる 2,3 結合したシアル酸の両方が発現しているため、豚は人だけでなく鳥のウイルスに感染することが知られている。

(2) 自然界では、H1N1(1993年、中国)、H4N6(1999年、カナダ)、H9N2 亜型鳥ウイルス(2006年、中国)等の豚感染が報告されているが、いずれも一過性の発生であった。一方で、1979年ヨーロッパの豚に侵入した H1N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは、現在でも鳥型豚インフルエンザウイルスとして豚で循環している。こうした鳥ウイルスの豚での増殖能の違いをもたらす要因は良く分かっていない。

(3) ウイルスが、新しい宿主に適應するには宿主細胞への侵入と細胞内での増殖能の獲得の二つのステップが重要と考えられている。そのため、宿主細胞表面との結合性を決める赤血球凝集素(HA)蛋白に加え、ウイルスの内部遺伝子も宿主域決定に重要な役割を担っている。

(4) 宿主体内における主なウイルス増殖の場である鳥の腸管、豚の上部気道は、それぞれ約 41、37 である。そのため、鳥から豚に侵入したウイルスが、低温に順化することで増殖能を獲得する可能性がある。しかしながら、豚由来のウイルスの温度感受性はあまり研究されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、宿主体温の違いに着目し、鳥インフルエンザウイルスの豚での低温増殖性獲得に関わる因子の探索を目的とした。豚の呼吸器に由来する上皮細胞培養系を構築し、鳥ウイルスの豚細胞での低温増殖能の獲得に關与するウイルス遺伝子及びアミノ酸を推定する。

3. 研究の方法

(1) 豚肺胞上皮細胞を作出する。安楽死させた豚から肺を切り出し、pronase 処理後に得られた細胞群から肺胞上皮細胞を選択的に培養する。使用前に、上皮細胞に特異的に発現しているケラチンに対する抗体によって純度検定を行う。

(2) 異なる宿主から分離されたウイルスの温度感受性を調べる。鳥、豚、人に由来する

インフルエンザウイルスを異なる温度(33、37、41)で、犬腎臓由来(MDCK)細胞及び作出した豚肺胞上皮細胞(pAEpC)に感染させ、それぞれの感染力価 TCID₅₀を比較する。

(3) 低温での増殖能が低い野鳥ウイルスを選抜し、豚肺胞上皮細胞で低温条件(33)で連続継代する。連続継代後のウイルスの MDCK 細胞及び豚肺胞上皮細胞での温度感受性を感染力価 TCID₅₀により比較する。

(4) 豚細胞に低温順化した野鳥ウイルスの全遺伝子配列を決定し、低温順化前後に起きた塩基置換を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 豚肺胞上皮細胞培養系の構築。

選択的に培養した豚の肺由来細胞群を -80 から液体窒素へと段階的に凍結保存した。37 で急解凍後の豚肺由来細胞群を 37、5%CO₂ 下で再培養し、コンフルエント状態の細胞を得た(図1)。得られた豚肺由来細胞を 0.05%トリプシン-EDTA により分散させた後に、ケラチンに対する抗体と反応させた。FITC 標識した 2 次抗体との反応後に、フローサイトメトリー解析により、培養した豚の肺由来細胞の約 95%が上皮細胞であることを確認した。さらに、得られた豚肺胞上皮細胞の連続継代が可能であることを確認した。ただし、継代による豚肺胞上皮細胞の性質の変化を避けるため実験に使用する豚肺胞上皮細胞は 3 代までとした。

豚肺胞上皮細胞の TPCK-トリプシンに対する耐性濃度を調べるため、それぞれ 0、0.25、0.5、1.0、2.0ug/ml を加えた培地で培養した。0.5ug/ml 以上では、細胞シートを 3 日以上維持できなかったため、ウイルス感染時には 0.25ug/ml の TPCK-トリプシンを含む培地を用いることを決定した。鳥・豚由来のインフルエンザウイルスが作出した豚肺胞上皮細胞で増殖可能であることを確認した(図1)。

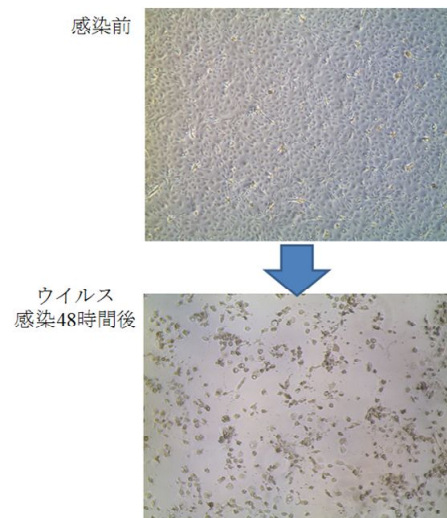


図1 A型インフルエンザウイルス感染により豚肺胞上皮細胞に起こるCPE

(2) 異なる宿主から分離された A 型インフルエンザウイルスの増殖至適温度の解析。

鳥由来インフルエンザウイルス 21 株、豚インフルエンザウイルス 17 株、人インフルエンザウイルス 6 株についての MDCK 細胞における温度感受性を明らかにした (図 2)。鳥ウイルスでは、野鳥及び七面鳥と鶏由来ウイルスとで異なる傾向が見られた。野鳥及び七面鳥由来の鳥ウイルス 12 株中 9 株は、33 での増殖能が 41 よりも低かった。一方で、鶏由来の鳥ウイルス 9 株中 7 株は、33 での増殖能が 41 よりも高かった。豚および人由来のウイルスは、全て 33 での増殖能が 41 よりも高かった。

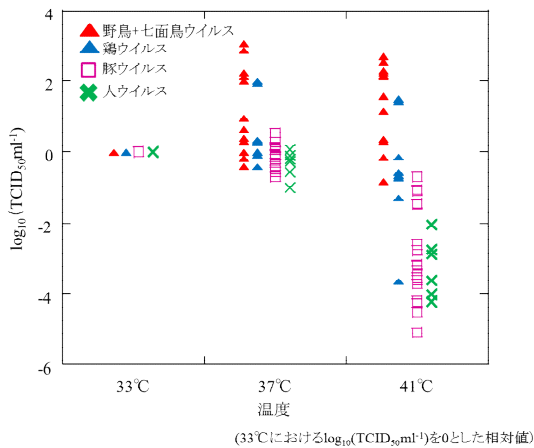


図2 異なる宿主から分離されたA型インフルエンザウイルスのMDCK細胞における温度感受性

(3) 低温条件(33)での増殖能が低い野鳥由来ウイルスの低温順化。

MDCK 細胞における低温条件(33)での増殖性が高温条件(41)よりも約 400 倍低かった野鳥由来ウイルス A/teal/Tottori/150/2002(H5N3)(Tottori 株)及び A/w.swan/Shimane/580/2002(H5N3)(Shimane 株)を選抜し、構築した豚肺胞上皮細胞に感染させ、33 で 14 代継代を繰り返した。その結果、豚肺胞上皮細胞での 33 での増殖性が 41 よりも 8 ~ 13 倍高い低温順化ウイルスを得た(図 3)。

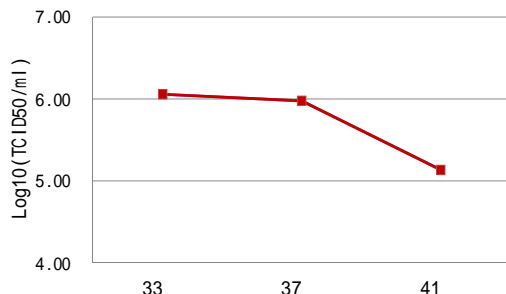


図3 低温順化後のTottori株の豚肺胞上皮細胞における温度感受性

(4) 低温馴化した Tottori 株と Shimane 株

の全ゲノム解析により、両ウイルスの PB2、PB1 及び HA 遺伝子の翻訳領域及び、Tottori 株においては NP 遺伝子の翻訳領域に非同義置換が認められた。さらに、Tottori 株の PB2 及び PA 遺伝子と Shimane 株の NA 遺伝子の非翻訳領域にもそれぞれ塩基置換が起きていることを見出した。

(5) 以上の結果から、鳥ウイルスの豚での増殖能獲得にポリメラーゼ活性や HA 蛋白が関与している可能性が示された。また、PB2、PA、NA 遺伝子の非翻訳領域の関与の可能性も示唆された。本研究で見出した塩基置換は、これまでに報告されている宿主域決定に關与する部位とは異なっている。今後、それぞれの塩基置換が低温増殖能と豚細胞での増殖能の獲得にどのように関与するかを解析する計画である。これらの機能を明らかにすることで、A 型インフルエンザウイルスの宿主域決定要因のさらなる解明に寄与することができると考える。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹前 喜洋 (TAKEMAE, Nobuhiro)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研

究機構 動物衛生研究所・インフルエンザ・
プリオン病研究センター・主任研究員
研究者番号：10584386

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：