

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870444

研究課題名(和文) ウズラ由来H7亜型鳥インフルエンザウイルスの鶏への病原性に寄与するアミノ酸の同定

研究課題名(英文) Generation of highly pathogenic phenotype H7 avian influenza virus from an avirulent quail isolate and its determinant

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：国内のウズラから分離されたH7亜型鳥インフルエンザウイルスは、ウズラにも鶏にも致死性を示さない低病原性株であった。本研究で、この株をウズラや鶏に接種して感染を繰り返すことで、鶏に対して非病原性であったウイルスが高病原性に変異した。HA開裂部位やM2蛋白質の変異によってウイルスの増殖性が、またHA蛋白質の複数箇所の変異によって鶏に対する感染性が上がることで病原性を獲得したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the risk of the evolution of a low pathogenic H7N6 virus into a high pathogenic form in poultry farms, an isolate, A/quail/Aichi/1/2009(H7N6), was intracerebrally passaged in adult quail and chickens. After passages in quail and chickens, the HA cleavage site acquired two additional arginine residue. This mutant showed a characteristic of high pathogenic avian influenza viruses: it replicated in tissue culture cells in the absence of exogenous trypsin. Plaque formation assay revealed that the substitution at 44th residue of M2 protein enhanced propagation of the H7N6 virus. However, this mutant was not yet lethal to 4-week-old chicken. Additional passage in chicken induced several mutation. This mutant has shown a 100% mortality of chickens, indicating this variant was highly pathogenic. These results imply that a low pathogenic H7 virus isolated from a quail has the potential to become highly pathogenic while circulating in quail and chicken.

研究分野：獣医学領域におけるウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザ 病原性 鶏 ウズラ HA開裂部位

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する高病原性鳥インフルエンザウイルスは、HA 亜型が H5 または H7 のウイルスに限られている。これは、ウイルスの病原性決定因子である HA 開裂部位アミノ酸配列が、H5 亜型と H7 亜型ウイルスでのみ強毒型に変異しうるためと考えられている。すなわち、家禽で高病原性鳥インフルエンザが発生する機序として、野生水禽の持つ H5 または H7 亜型の鳥インフルエンザウイルスが家禽に偶発的に伝播し、家禽の間で感染を繰り返す間に、HA 開裂部位その他の病原性に関与するアミノ酸が変異し、鶏に対して極めて高い致死性を示す高病原性株に変化することが考えられる。

これまで、H5 亜型ウイルスについては、H5 亜型の野生コハクチョウ分離株を実験的に鶏で継代することで強毒化に成功した報告があるが、H7 亜型ウイルスについては、実験継代のみによって強毒化に成功した例はない。

2009 年国内のウズラから分離された H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスは、低病原性ではあったものの、病原性決定因子である HA 開裂部位に、既知の強毒株に見られるような塩基性アミノ酸の連続配列 (KRR) を有していたことから、高病原性株へ変異する途上の株であると考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、2009 年、国内のウズラ農場で分離された H7N6 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルス A/quail/Aichi/1/2009 を家禽 (ウズラおよび鶏) で継代することによって、鶏に対する致死性を示す高病原性株の作出を試みた。これによって、H7 亜型ウイルスが、家禽で感染を繰り返す間に高病原性株に変異しうることを実験的に証明するとともに、同一株の性状の変化を追跡することで、病原性獲得に寄与するアミノ酸を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

高病原性株の作出は、野外における家禽間での感染の繰り返しを想定して、家禽鳥種を用いた継代を繰り返し実施することで行った。

具体的には、脳継代の場合、各継代時に軽度麻酔下にある 2 羽のウズラ成鳥または初生鶏あるいは 1~4 週齢の鶏の脳腔内に、ウイルスを含む微量の脳乳剤 (1 代目はウイルスを含む漿尿液) を、2 段針を用いて直接接種した。肺継代の場合、3~4 週齢の鶏に継代材料を経鼻接種した。接種 4~5 日後に、脳継代の場合は脳を、肺継代の場合は肺を採取して乳剤を調製し、ウイルス力価を測定したうえで、次代の継代材料とした。

また、このようにして調製した組織乳剤から直接ウイルス RNA を抽出し、継代株のゲノムの塩基配列を決定した。

継代変異株の病原性を決定するための鶏静脈内接種試験には、各継代材料を発育鶏卵に接種し、増殖させたウイルス液を用いた。PBS で 10 倍希釈したウイルスを 4~6 週齢鶏に 0.2ml ずつ静脈内接種した後、10 日間観察した。定義上、鶏静脈内接種による致死率が 75% 以上のウイルスを高病原性で見なすが、本研究では、鶏への経鼻接種試験をあわせて実施し、呼吸器感染で鶏への致死性を示す高病原性株の作出を目指した。

4. 研究成果

(1) 高病原性ウイルス作出のための継代

2009 年にウズラから分離された株 (Qb0) を、まずウズラで 16 回脳継代した (Qb1-Qb16)。その後、初生鶏で 5 回脳継代した後 (Qb16Cb1-Qb16Cb5) 選択圧を強める目的で 1~3 週齢鶏で 3 回脳継代した (Qb16Cb6-Qb16Cb8)。最後に、より鶏に適応させる目的で 3~4 週齢鶏で 3 回肺継代を実施した (Qb16Cb8Cl1-Qb16Cb8Cl3)。

継代開始前のウズラ分離株 (Qb0) を、はじめから初生鶏で継代すると、継代 2 代目でウイルスは回収できなくなった。

(2) 継代によるアミノ酸変異導入と病原性の評価

A/quail/Aichi/1/2009(H7N6) をウズラ脳で 16 継代する間に、HA 開裂部位に塩基性アミノ酸 1 個が挿入されて配列が KRRR となり、さらに PA 蛋白質にアミノ酸置換が 1 ヶ所導入された (Qb16)。これらの変異を持つ Qb16 継代株の静脈内接種による鶏の致死性は 0% であった。

Qb16 継代株を初生鶏脳で 4 継代する間に、HA 開裂部位に塩基性アミノ酸 1 個が挿入されて配列は KRRRR となり、その後、M2 蛋白質にアミノ酸置換が 1 ヶ所導入された (Qb16Cb4)。HA 開裂部位は強毒型に見られる配列に変化した。Qb16Cb4 継代株の静脈内接種による鶏の致死性はいまだ 0% であった。

Qb16Cb4 継代株を初生~3 週齢鶏脳で 4 継代する間に、4 ヶ所のアミノ酸置換が導入された (Qb16Cb8)。これらの変異をもつ Qb16Cb8 継代株を静脈内接種した鶏が 5-8 日間で死亡、致死性が 100% に達したことで、定義上の高病原性株の作出に成功した。

脳継代によって得られた高病原性の Qb16Cb8 継代株を 3~4 週齢鶏に経鼻接種し、肺継代を 3 回繰り返す間に、脳継代で変異したアミノ酸 3 ヶ所が元に戻り、新たに 3 ヶ所のアミノ酸置換が HA 蛋白質に導入された (Qb16Cb8Cl3)。Qb16Cb8Cl3 継代株を静脈内接種した鶏は 2-4 日間で死亡、致死性は 100% を維持していた。

(3) 継代によって導入されたアミノ酸変異のウイルス増殖性への影響

Qb16Cb8 継代株に認められた HA 開裂部

位への2個の塩基性アミノ酸挿入、M2蛋白質のアミノ酸置換、その他4ヶ所のアミノ酸置換が、ウイルスの増殖性に与える影響について、鶏胚線維芽細胞を用いたプラーク形成試験により解析した。

HA開裂部位に1個の塩基性アミノ酸が挿入されたQb16継代株はトリプシン非存在下でプラークを形成しなかったが、2個の塩基性アミノ酸が挿入されたQb16Cb1継代株以降の株はトリプシン非存在下でもプラークを形成した(図1)。2個の塩基性アミノ酸挿入によって、強毒株の特徴であるトリプシン非存在下での増殖性を獲得したことが確認された。形成されたプラークサイズは、M2蛋白質の変異が導入される前後で著しく増加した。このことから、M2蛋白質に導入された変異が高病原性ウイルスの増殖性を増強する変異であったことが示された。

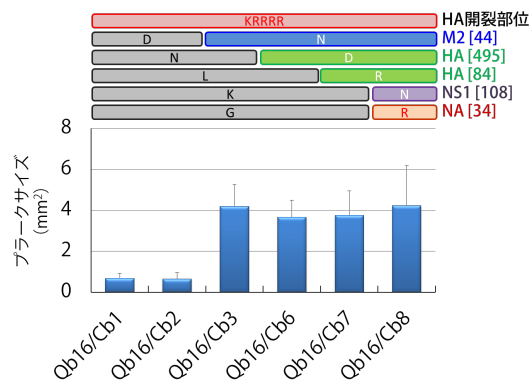


図1. トリプシン非存在下でのH7N6ウイルス継代株のプラーク形成能

また、Qb16Cb5継代株以降に認められた4ヶ所のアミノ酸置換のうち、3箇所は肺継代によって元のアミノ酸に戻った。肺継代後のQb16Cb8C13継代株も鶏への致死性100%を示したことから、復帰した3箇所のアミノ酸は鶏への病原性に関与しないことが推察された。一方で、肺継代後も維持されたHA蛋白質の1ヶ所のアミノ酸置換と、Qb16Cb8C13継代株までに導入された3ヶ所のアミノ酸置換は全て宿主細胞との結合を担うHA蛋白質に集中しており、レセプター特異性のようなウイルスの感染性や宿主特異性に影響する変異であった可能性が考えられた。

(4) 継代株の経鼻接種による鶏への感染性の評価

最後に、各継代株の鶏への感染性を検討した。継代前(Qb0)株、ウズラ脳16継代後(Qb16)株、プラーク形成試験の成績から強毒株の特徴を獲得したQb16Cb4継代株を、それぞれ4週齢鶏に経鼻接種すると、いずれの株でも臨床徴候を示す鶏は認めなかった。Qb0およびQb16接種鶏では咽喉頭スワブからのみウイルスが分離され、Qb16Cb4継代

株接種鶏ではクロアカスワブからもウイルスが分離された。

Qb16Cb8継代株経鼻接種鶏では4羽中1羽が感染し、沈鬱状態を呈した。しかし、3羽は感染しなかったことから、鶏呼吸器へ適応させるために肺継代を実施したところ、継代に用いた鶏が沈鬱症状を呈するようにウイルスは変化した。

本研究では、H7亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスが、ウズラと鶏を用いた継代のみによって強毒化しうることを示した。

今回はウズラ分離株からの継代開始であったが、野生水禽由来鳥インフルエンザウイルスが鶏に感染し、高病原性株に変化するためには、HA開裂部位やM2蛋白質で見られたウイルス増殖性に関する変異と、肺継代後に導入または維持されたHA蛋白質の変異のような感染性に関する変異の両方が必要と考えられた。

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 2件)

Tatsufumi Usui, Yukiko Uno, Ikuto Kato, Yoshikazu Fujimoto, Hiroshi Ito, Toshihiro Ito, Tsuyoshi Yamaguchi, Generation of a highly pathogenic H7N6 subtype avian influenza virus from an avirulent isolate by serial intracerebral passage in quail and chickens, XVIth International Congress of Virology, 2014/7/28, Montreal (Canada)

笛吹達史、宇野有紀子、伊藤啓史、伊藤壽啓、山口剛士、ウズラ由来 H7 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスの強毒化に関する研究、第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2013 年 6 月 28 日、北海道大学大学院獣医学研究科講堂(北海道札幌市)

〔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

笛吹 達史 (USUI, Tatsufumi)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：80508482