

委託プロジェクト研究
「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」
平成29年度 最終年度報告書

13406421

海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延の防止技術の開発

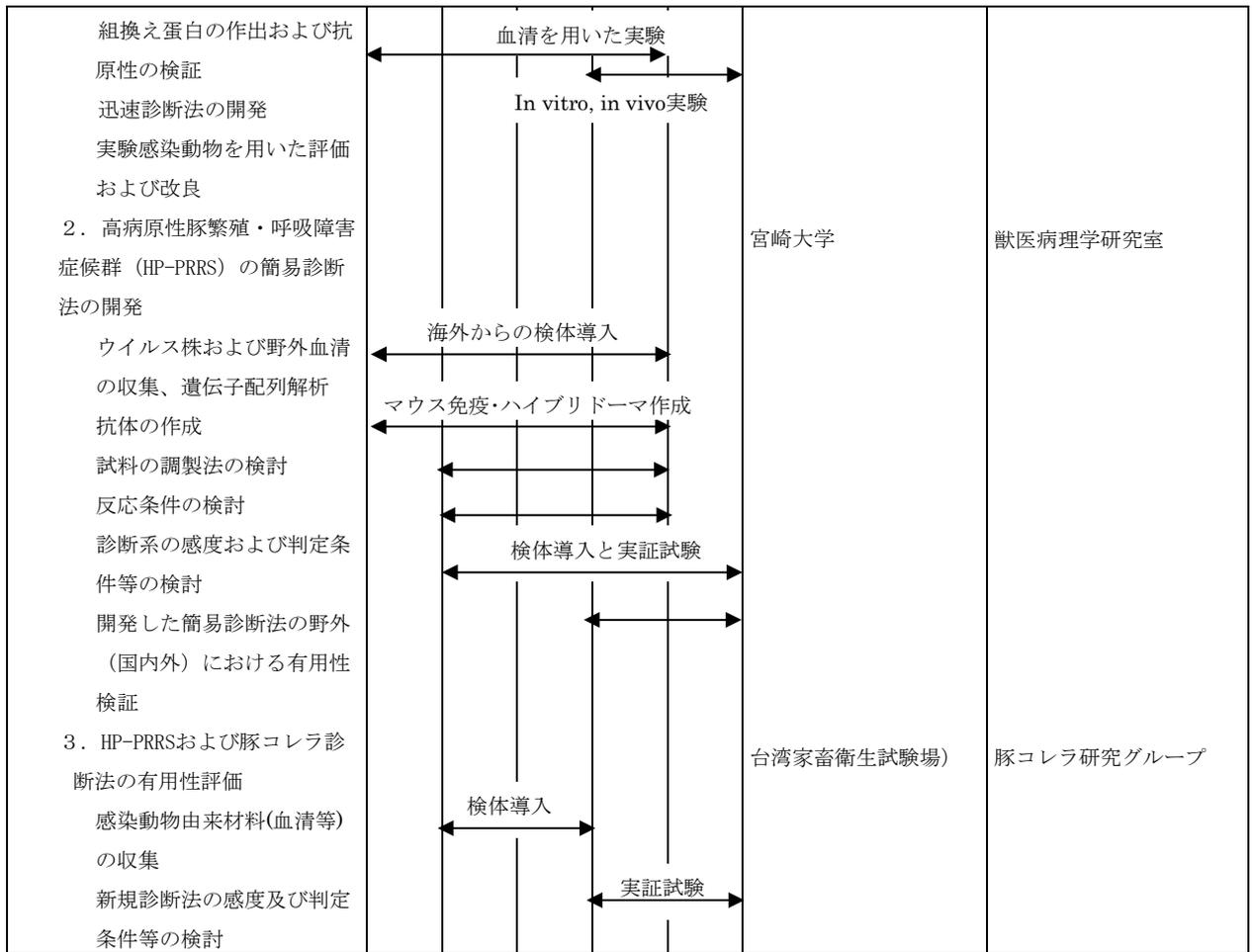
研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
研究開発責任者	西藤 岳彦
共同研究機関	国立研究法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究部門
	社団法人農林水産・食品産業技術振興協会 農林水産先端技術研究所
	国立大学法人 宮崎大学農学部獣医学科
	学校法人酪農学園 酪農学園大学獣医学群
	国立大学法人 北海道大学大学院医学研究科 微生物学講座 免疫学分野
	国立大学法人 広島大学大学院生物圏科学研究科 分子生命開発学講座 免疫生物学研究室
	国立大学法人 信州大学農学部食料生産科学科動物生体機構学研究室
	京都府公立大学法人 京都府立医科大学大学院医学研究科 感染病態学
	独立行政法人 理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット
	タイ国立家畜衛生研究所
	台湾家畜衛生試験所
普及・実用化支援組織	なし
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-7738 FAX : 029-838-7738 E-mail : taksaito@affrc.go.jp

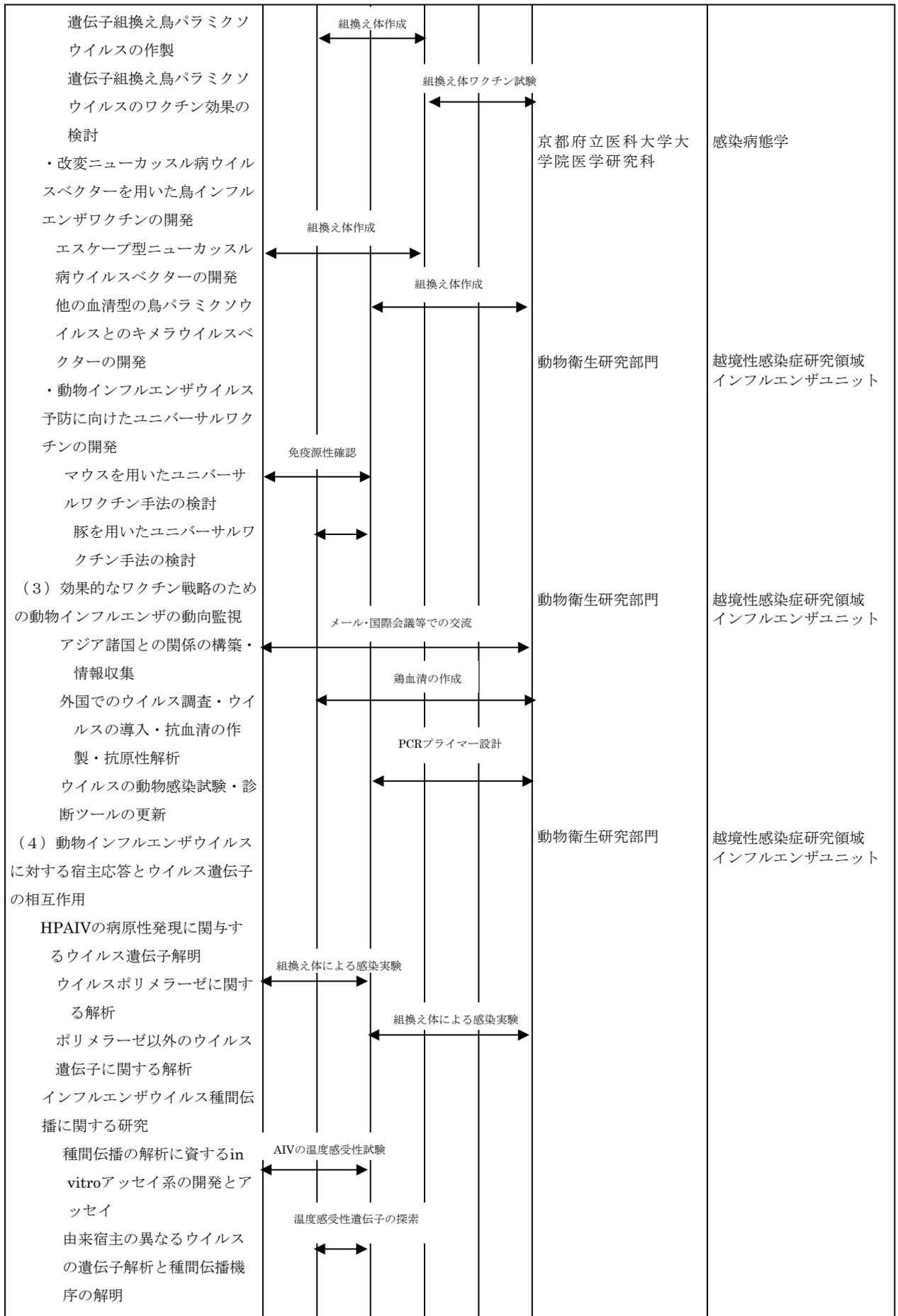
<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

1. 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発

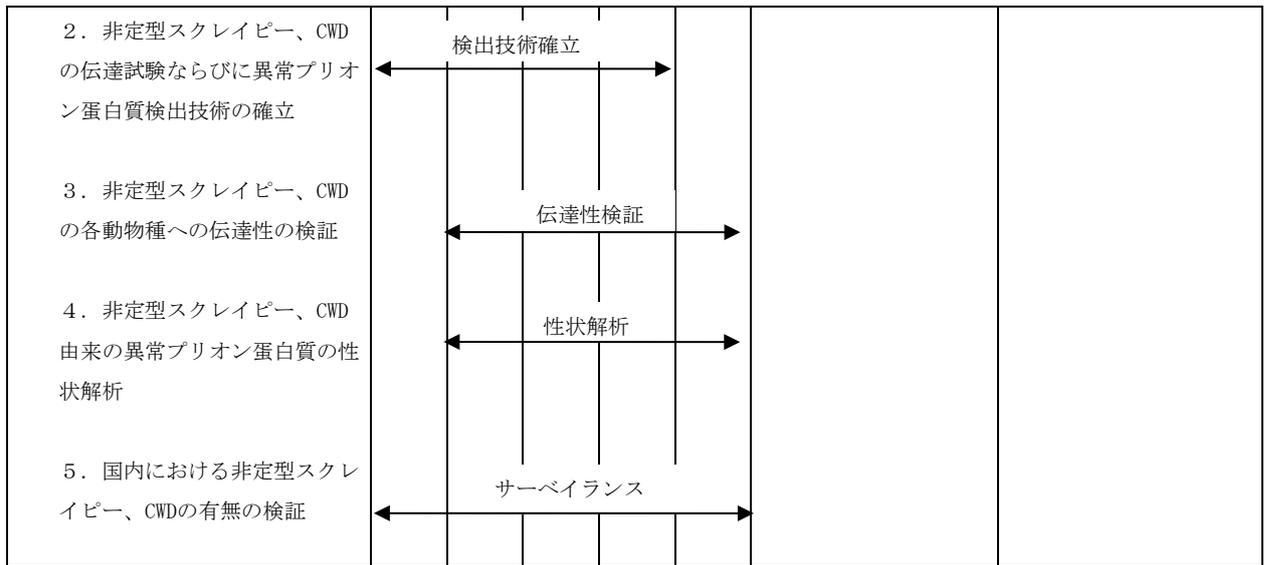
研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室			
	25	26	27	28	29	機関	研究室		
(1) 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発 HP-PRRSおよび豚コレラの疫学・病態解明と有効な予防法の開発 1. HP-PRRSおよび豚コレラの発病機構の解明と予防法の開発 HP-PRRS ウイルスの感染実験系確立 PRRSウイルスの病原因子の特定 東南アジアで流行している豚コレラウイルスの病原性 HP-PRRSウイルスワクチンの開発 HP-PRRSおよび豚コレラワクチンの効果試験 2. HP-PRRSウイルスおよび豚コレラウイルスのゲノム解読と疾病関連遺伝子群の特徴の調査 全長ゲノム解読法の開発 ウイルス野外株のゲノム解読 疾病関連遺伝子の解析 ウイルス亜集団検出法の開発 3. HP-PRRSウイルスおよび豚コレラ流行実態解明と病原性解析 PRRSおよび豚コレラの流行実態解明 モデル地域でのワクチン効果の実証試験						農研機構動物衛生研究部門	発病制御ユニット		
	豚感染実験								
	遺伝子解析								
	豚感染実験								
	In vitro実験								
	In vitro実験								
2. HP-PRRSウイルスおよび豚コレラウイルスのゲノム解読と疾病関連遺伝子群の特徴の調査 全長ゲノム解読法の開発 ウイルス野外株のゲノム解読 疾病関連遺伝子の解析 ウイルス亜集団検出法の開発 3. HP-PRRSウイルスおよび豚コレラ流行実態解明と病原性解析 PRRSおよび豚コレラの流行実態解明 モデル地域でのワクチン効果の実証試験						農林水産先端技術研究所	動物生体防御ユニット		
	NGS解析								
	NGS解析								
	データベース解析								
	NGS解析								
(2) HP-PRRS および豚コレラの診断法の高度化 1. 豚コレラの簡易診断法の開発						タイ国立動物衛生研究所	ウイルス病研究室		
	ウイルス・血清調査								
	豚感染実験								
(2) HP-PRRS および豚コレラの診断法の高度化 1. 豚コレラの簡易診断法の開発						農研機構動物衛生研究部門	海外病ユニット		
	遺伝子組換え実験								





4. 非定型BSEの発生機序の解明とリスク管理基盤技術の開発

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(1) 非定型BSEの高感度検出法の開発						農研機構・動物衛生研究部門	プリオン病ユニット
1. H型非定型BSEの増幅法の開発	PrP ^{Sc} 増幅条件の最適化						
2. L型非定型BSEの増幅法の開発		PrP ^{Sc} 増幅条件の最適化					
3. プリオンの体内分布・動態解析			PrP ^{Sc} と感染性の体内分布				
(2) 非定型BSE経口感染牛の病態解析							
1. L型BSE発症脳乳剤の牛への経口接種による伝達試験	L型BSE伝達試験						
2. H型BSE発症脳乳剤の牛への経口接種による伝達試験			H型BSE伝達試験				
(3) 非定型BSEプリオンの伝達性に基づく性状解析							
1. ウシプリオンタンパク質過発現マウスを用いた非定型BSEプリオンの性状解析	遺伝子改変マウスを用いた生物学的性状解析						
2. 野生型マウスを含む異種動物に伝達した非定型BSEの性状解析		遺伝子改変を含むマウスモデルによる生物学的性状解析					
3. 非定型BSEの細胞への感染実験			神経幹細胞による感染モデル構築の試み				
(4) 非定型プリオン病のサーベイランスとそのリスク評価							
1. 非定型スクレイパー、CWDのサーベイランス体制の構築	サーベイランス体制構築						



I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関	研究担当者
<p>研究開発責任者</p> <p>1. 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発</p> <p>（1）HP-PRRSおよび豚コレラの疫学・病態解明と有効な予防法の開発</p> <p>1. HP-PRRSおよび豚コレラの発病機構の解明と予防法の開発</p> <p>2. HP-PRRSウイルスと豚コレラウイルスのゲノム解読と疾病関連遺伝子群の特徴の調査</p> <p>3. HP-PRRSウイルスおよび豚コレラ流行実態解明と病原性解析</p> <p>4. HP-PRRSおよび豚コレラ流行実態解明と病原性解析（～2017.3）</p> <p>（2）HP-PRRSおよび豚コレラの診断法の高度化</p> <p>1. 豚コレラの簡易診断法の開発</p> <p>2. 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）の簡易診断法の開発</p> <p>3. HP-PRRS及び豚コレラ診断法の有用性評価</p> <p>2. 口蹄疫の侵入・まん延</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p> <p>農研機構動物衛生部門</p> <p>農研機構動物衛生部門</p> <p>農林水産先端技術研究所 農研機構 生物機能利用研究部門</p> <p>タイ国立家畜衛生研究所</p> <p>農研機構動物衛生部門</p> <p>農研機構動物衛生部門</p> <p>宮崎大学・獣医病理学研究室</p> <p>台湾家畜衛生試験場</p> <p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>◎ 横山隆（～2014.3） ◎ 西藤岳彦（2014.4～）</p> <p>○ 川島健二</p> <p>△ 高木道浩</p> <p>△ 両角岳哉（～2017.3） △ 上西博英（2017.4～）</p> <p>△ Boonpornprasert Prakit</p> <p>△ 高木道浩</p> <p>△ 亀山健一郎</p> <p>△ 山口良二</p> <p>△ 張家宜</p> <p>○ 菅野徹（～2015.3） 山川睦（2015.4～）</p>

<p>防止技術の開発 (1) 口蹄疫ウイルスの感染伝播様式の解析</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 深井克彦 森岡一樹 山田学 嶋田伸明 西達也 吉田和生 山川睦</p>
<p>(2) 口蹄疫流行時のウイルス動態の解析とまん延防止技術の高度化</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 山田学 西達也 深井克彦 森岡一樹 嶋田伸明 吉田和生 山川睦</p>
<p>(3) 口蹄疫ウイルスの感染・増殖の分子基盤の解析</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 菅野徹 (～2015.3) 山川睦 (2015.4～) 西達也 深井克彦 山田学 森岡一樹 嶋田伸明</p>
<p>(4) 口蹄疫流行時における抗ウイルス活性を有する防疫資材活用技術の高度化 (～2016.3)</p>	<p>酪農学園大学</p>	<p>△ 桐澤力雄</p>
<p>3. 高病原性鳥インフルエンザの効果的な発生予防技術の開発 (1) 鳥インフルエンザに対する実用的な粘膜ワクチンの開発</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>○ 西藤岳彦</p>
<p>1. 鳥インフルエンザに対する点眼ワクチンの実用化 2. 鳥インフルエンザに対する点眼ワクチンのための新規アジュバント開発 (～2015.3)</p>	<p>農研機構動物衛生部門 北海道大学</p>	<p>△ 彦野弘一 (～2015.3) △ 金平克史 (～2017.3) △ 竹前喜洋 (2017.4～) △ 瀬谷司</p>

<p>3. ワクチン投与方法が家禽の免疫応答に及ぼす影響の解明</p>	<p>広島大学</p>	<p>△ 古澤修一</p>
<p>4. 家禽特有の粘膜免疫組織の機能の解明 (～2015.3)</p>	<p>信州大学</p>	<p>△ 平松浩二</p>
<p>5. 抗インフルエンザ剤シード物質の探索</p>	<p>理化学研究所</p>	<p>△ 間陽子</p>
<p>(2) 有効なインフルエンザワクチン技術に資する新規技術開発</p>		
<p>・新規ウイルスベクターを用いた鳥インフルエンザワクチンの開発</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 彦野弘一 (～2015.3) △ 常國良太 (2015.4～)</p>
		<p>内田裕子 竹前喜洋 谷川太一朗 西藤岳彦</p>
<p>(1) 動物インフルエンザウイルス予防に向けたユニバーサルワクチンの開発 (～2016.3)</p>	<p>京都府立医科大学 農研機構動物衛生部門</p>	<p>中屋隆明 △ 彦野弘一 (～2015.3) △ 常國良太 (2015.4～)</p>
<p>効果的なワクチン戦略のための動物インフルエンザの動向監視</p>		
<p>(1) 効果的なワクチン戦略のための動物インフルエンザの動向監視</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 内田裕子 常國良太 竹前喜洋 谷川太一朗 西藤岳彦</p>
<p>動物インフルエンザの新たな防除技術の基盤解明</p>		
<p>(1) 動物インフルエンザウイルスに対する宿主応答とウイルス遺伝子の相互作用</p>	<p>農研機構</p>	<p>△ 西藤岳彦 内田裕子 常國良太 竹前喜洋 谷川太一朗</p>
<p></p>	<p>広島大学</p>	<p>堀内浩幸</p>

<p>(2) トランスジェニック技術を用いた高病原性鳥インフルエンザの発症機構の解析 (～2015.3)</p>	<p>農研機構動物衛生部門 農研機構畜産草地研究部門</p>	<p>△ 金平克史 田上貴寛</p>
<p>4. 非定型BSEの発生機序の解明とリスク管理基盤技術の開発</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>○ 村山裕一 (～2016.3) ○ 岩丸祥史 (2016.4～)</p>
<p>(1) 非定型BSEの高感度検出の開発</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 村山裕一 (～2016.3) △ 松浦裕一 (2016.4～)</p>
<p>(2) 非定型BSE経口感染牛の病態解析</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 岡田洋之</p>
<p>(3) 非定型BSEプリオンの伝達性に基づく性状の解析</p>	<p>農研機構動物衛生部門 農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 舛甚賢太郎 (～2014.3) △ 宮澤光太郎 (2014.4～)</p>
<p>(4) 非定型プリオン病のサーベイランスとそのリスク評価</p>	<p>農研機構動物衛生部門</p>	<p>△ 今村守一 (～2017.3) △ 岩丸祥史 (2017.3～)</p>

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	13406421	研究期間	平成25～29年度
大課題名	食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト		
中課題名	海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延の防止技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 西藤 岳彦		

I-1. 研究目的

わが国の食生活の多様化や消費動向の変化に伴い、良質な動物性蛋白質の供給源である畜産物の消費が増加している。畜産はわが国の農業産出額の約30%を占め、農業の中でも大きな比重を占めている。牛海綿状脳症（BSE）の発生以来、安全な食品に対する国民の関心が高まるとともに、様々な取組がなされている。

ひとたび高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）、口蹄疫などの海外悪性伝染病が発生すると、防疫のため大量の家畜の殺処分が必要とされ、家畜生産の基盤を破壊し、地域社会に経済的、社会的な大損失をもたらすことは記憶に新しい。HPAIは、わが国を含め世界的な発生を引き起こし、現在ではアジアでの常在化が問題となっているほか、新型インフルエンザとしてヒトへの伝播も懸念されている。BSEは、肉骨粉の使用規制により世界的な発生が減少が認められているが、孤発性の可能性も示唆されている原因不明の非定型BSEの対応も求められている。これら人獣共通感染症は、食の安全、健全な畜産物の安定供給への影響だけでなく、人の生命や健康に直接的な危害要因にもなる。

また、東アジア・東南アジアではHPAIの常在化が問題となっているほか、わが国で撲滅に成功した豚コレラ、口蹄疫のまん延に加え、致死率の高い豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）が報告されるなど多くの問題が山積している。北米で蔓延しているシカ慢性消耗病は、害獣として駆除したシカの食用を進める上で、注意が必要なプリオン病である。欧州で発生が増加している非定型スクレイピーの侵入防止も重要な課題となっている。

このため、本研究では、

1. 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発
2. 口蹄疫の侵入・まん延防止技術の開発
3. 高病原性鳥インフルエンザの効果的な発生予防技術の開発
4. 非定型BSEの発生機序の解明とリスク管理基盤技術の開発

により、HP-PRRS, 豚コレラ、口蹄疫、HPAIV, 非定型BSEの発症、病原性発現機序を解析し、これら疾病のまん延防止技術の開発を目標とする。

その結果、

1. これらの社会的、経済的に重要な家畜疾病の防除技術の開発・高度化
2. 健全な家畜・家禽の安定生産や安全な畜産物の供給に貢献することが期待される。

I-2. 研究結果

1. 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発においては、HP-PRRSウイルス（PRRSV）の分離株による感染実験では、株により病原性が異なっていることを明らかにした。また、タイ、ベトナム、台湾でのHP-PRRSおよび豚コレラの流行状況が明らかになるとともに、CSFワクチンGPE(-)株が、近年のアジア各国で流行するCSFV株（遺伝型2.1）に対して、臨床症状、ウイルス血症および病変形成を抑制することを明らかにした。更に、HP-PRRSおよび豚コレラウイルスの全ゲノム解析技術が確立された。
2. 口蹄疫の侵入・まん延防止技術の開発においては、口蹄疫ウイルス0/JPN/2010株の牛、豚、山羊を用いた同居感染試験によって、ウイルスへの感受性は山羊 \geq 牛 $>$ 豚という傾向であり、ウイルス接種動物として、豚は牛や山羊よりも同居感染の成立率が高く、ウイルス排泄量は豚 $>$ 牛 $>$ 山羊という傾向であると推測された。また、口蹄疫ウイルスの組換えウイルス作成技術を確認し、組換えウイルスの乳飲みマウスに対する病原性を解析したところ、病原性株のVP1タンパクおよびRNAポリメラーゼをそれぞれ非定型的病原性株のものに組み換えたウイルスが低い病原性を示すことを明らかにした。
3. 高病原性鳥インフルエンザの効果的な発生予防技術の開発においては、ニューカッスル病に対するワクチンで免疫されている鶏においても防御免疫を誘導することが可能な鳥パラミクソウイルスベクターを用いた鳥インフルエンザワクチンの作出に成功した。また、国内外の機関との連携によって、動物衛生、公衆衛生上注意を要する鳥インフルエンザウイルスを導入し、感染実験、遺伝子解析などでウイルス学的性状を明らかにするとともに、H7N9亜型AIVを検出可能な新規遺伝子診断用プライマーを作出し、全国の病性鑑定家畜衛生保健所に配布した。さらに、HPAIVの病原性発現にかかわるウイルス遺伝子変異を同定した。
4. 非定型BSEの発生機序の解明とリスク管理基盤技術の開発においては、非定型BSE(L-BSEとH-BSE)の異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を超高感度に検出する手法を確認するとともに、ヒツジプリオン蛋白質(PrP)過発現マウス等の遺伝子改変マウスを用いた非定型BSE伝達試験から、異種間伝達によりL-BSEの宿主域が変化することを明らかにした。また、L-BSEの経口接種により、ウシへの感染性が確認された。更に、非定型スクレイピーサーベイランスにより、本邦初となるヒツジの非定型スクレイピーと2例目となるヤギの非定型スクレイピーを摘発した。

I-3. 今後の課題

引き続き国内への海外重要伝染病侵入のリスクは低下しておらず、更にアフリカ豚コレラのような新たな脅威も出現している。東南アジアや近隣諸国の研究者間での密接な連携強化が重要であると同時に、重要病原体の研究目的での導入の簡素化のためには双方の動物衛生当局間での連携強化が必要である。豚コレラにおいては、引き続き抗体検査において交差性を示すペスチウイルス属のウイルス（豚コレラウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス1、ボーダー病ウイルス）との鑑別診断法の確立が必要である。HPAI対策においては、国内への侵入リスクを低下させるためには、アジアの常在国での対策強化が必須であり、これらの地域で安価で少ない労働力で利用できる感染防御可能なワクチン開発が重要である。非侵襲性材料（唾液）を用いたBSE発症前診断法の確立が必要であろう。

中課題番号	13406421	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1		
中課題名	海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延防止技術の開発		
小課題名	高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群（HP-PRRS）および豚コレラの侵入・まん延防止技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	川畷健司・農研機構 動物衛生研究部門		

1) 研究目的

アジア諸国において、2006年以降、高熱を主徴とし、通常のPRRSとは異なり死亡率が極めて高いPRRSウイルス（PRRSV）による疾病（いわゆる高病原性PRRS：HP-PRRS）が、甚大な被害をもたらしている。HP-PRRSの原因ウイルスはゲノム配列の一部に特定の欠損領域があることから従来型のPRRSVとは区別されているが、ウイルスの遺伝学的特徴と病原性との関連性は未だ明らかにされていない。一方、2007年4月をもって我が国から清浄化された豚コレラ（CSF）は、世界的には依然として最重要とされる家畜感染症のひとつであり、HP-PRRSと同様にアジア全域に広がっている。国際物流の活発化・迅速化によって、これらの重要家畜伝染病が我が国へ侵入するリスクが高まっていると考えられ、予断を許さない状況にある。このため、国際協調を基にHP-PRRSおよびCSFに対する監視体制の強化ならびに我が国への侵入、まん延の防止に向けて、アジアにおける両ウイルスの流行株の発病機構の解明や効果的な予防技術の開発に取り組む必要がある。本小課題では、（1）HP-PRRSおよびCSFの疫学・病態解明と有効な予防法の開発においては、アジア地域における流行ウイルスの性状解析や動態解明を行うとともに、HP-PRRSについてベトナムで収集した分離株を用いて発症モデルを構築し病原性を明らかにするとともに、それを規定する要因を探索する。一方、CSFについては、東南アジアで流行するウイルスの遺伝子型や病原性が不明確であるため、東南アジア分離株の性状解析の結果に基づいて選抜した株を用いた感染実験を行うとともに、既存ワクチンの有用性を検証する。また、（2）HP-PRRSおよびCSFの診断法の高度化においては、迅速・高感度な診断法の開発を通じて、その侵入・蔓延防止対策の強化を目指す。

2) 研究成果

（1）HP-PRRSおよびCSFの疫学・病態解明と有効な予防法の開発

実施課題（1）－1 HP-PRRSおよびCSFの発病機構の解明と予防法の開発

ベトナムなど東南アジアで流行しているHP-PRRSウイルス（HP-PRRSV）は2つのgeno-groupに区別された（図1）。Geno-group A（JXA-1 like）は2007年に流行した株と2010年以降の一部のウイルス株、一方、geno-group B（SX09-like）は2010年以降のほとんどのウイルス株から構成された。また、2011年以降、中国で使用されているHP-PRRSに対する弱毒生ワクチン株（PRRS vaccine JXA-R）に類似するウイルスが検出された。

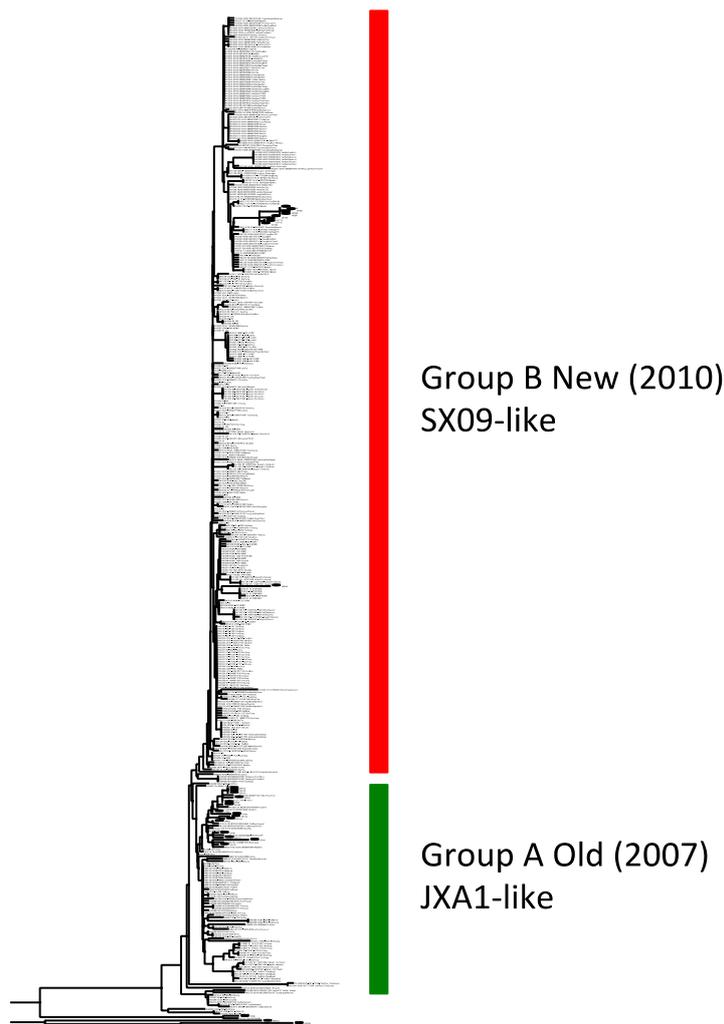


図1 ベトナムで検出されたHP-PRRSVのORF5遺伝子に基づく分子系統樹解析 (2007-2017)

妊娠豚(妊娠90日目)を用いたHP-PRRSVの感染実験では、ウイルス接種後2日目より食欲不振、沈うつ、体温が認められ、8日目に体温がピーク(40°C)に達し、ウイルス接種後10、11、16、17日目に流死産した。ウイルス接種後1日目より血中においてウイルスRNAが検出され、5～10日目には概算値 10^6 TCID₅₀/mlを示した(図2)。HP-PRRSV接種妊娠豚の各組織(肺、扁桃、子宮内膜・筋層など)、さらに胎子の肺、脾臓および肝臓でウイルスRNAが検出されたが、顕著な肉眼病変は認められず、組織学的検査において軽度な肺病変、子宮と胎子胎盤接合部に剥離が見られ(図3)、免疫組織化学的染色により妊娠豚の肺、子宮などに少数のウイルス抗原が検出された。妊娠豚(妊娠63日目)を用いたHP-PRRSVの感染実験では、妊娠90日目の妊娠豚における感染実験と同様の体温変化、臨床症状が観察され、ウイルス接種後10および12日目に流死産を起こし、1頭が接種後10日目に死亡した。ウイルス接種後1日目より血中においてウイルスRNAが検出され、7日目には概算値 $10^{6.4}$ TCID₅₀/mlを示した(図2)。また、妊娠90日目の妊娠豚における感染実験と同様に各組織でウイルスRNAが検出され、肉眼病変および免疫組織化学的染色も同様の結果であったが、組織学的検査において子宮と胎子胎盤接合部に剥離は認められなかった(図3)。

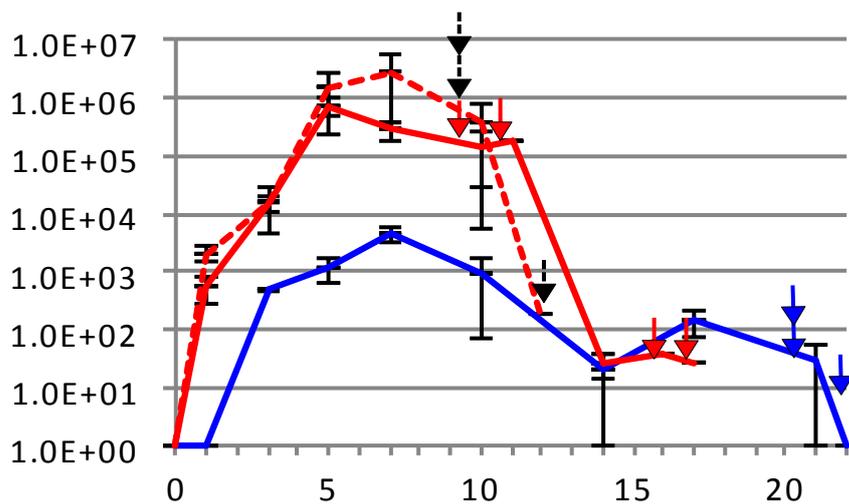


図2 HP-PRRSVおよびPRRSV国内流産株接種妊娠豚の血清中のウイルスRNA量

赤実線：妊娠90日目←HP-PRRSウイルス接種（10、11、16、17日目に流産）、赤点線：妊娠60日目←HP-PRRSウイルス接種（10、12日目に流産、10日目に母豚が死亡）、青実践：妊娠90日目←PRRSウイルス国内流産株接種（20、22日目に早産）
 図中の矢印は、異常産が確認されたことを示す。

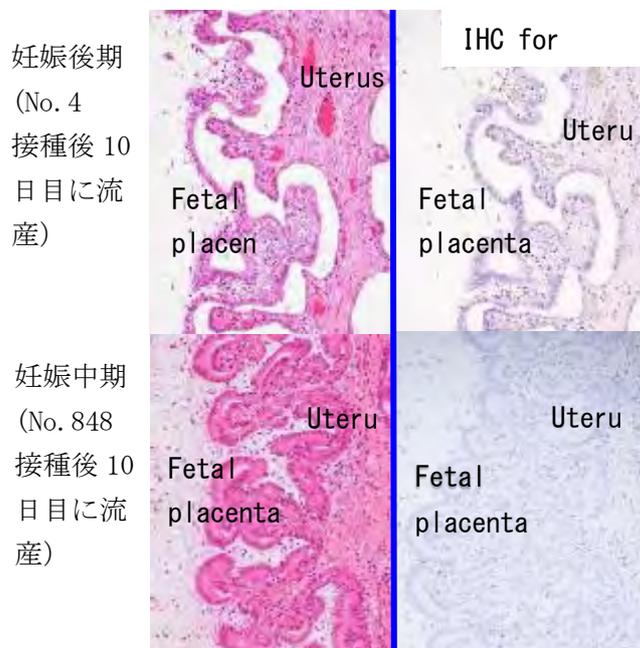


図3 HP-PRRSV接種妊娠中期および後期豚の子宮と胎盤部の変化

さらに、HP-PRRSV のベトナム分離 BL78 株（臨床症状を示していない肥育豚より分離）を接種した離乳豚では発熱開始時より食欲不振が見られたが、その後元気回復した。一方、HP-PRRSV ベトナム分離株 100186 614 株を接種した離乳豚では 41℃を越える発熱が観察され、発熱と共に食欲不振、沈うつとなり、BL78 株と比較して、重篤な臨床症状が観察された。また、国内分離株である EDRD1 株および Jpn5-37 株を接種した離乳豚ではやや発熱が観察されたが健康であり、BL78 株がより強い臨床症状を示した（図4）。ウイルスを接種した離乳豚の血清中ウイルス RNA 量は、BL78 株で概算値 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml、100186 614 株で概算値 10^7 TCID₅₀/ml、

EDRD1 株および Jpn5-37 株では最大で概算値 $10^{4.7} \sim 10^{5.3}$ TCID₅₀/ml が検出され、HP-PRRSV 両分離株は、国内分離株 2 株と比較して、ウイルスが体内で増殖していることが明らかとなった (図 5)。

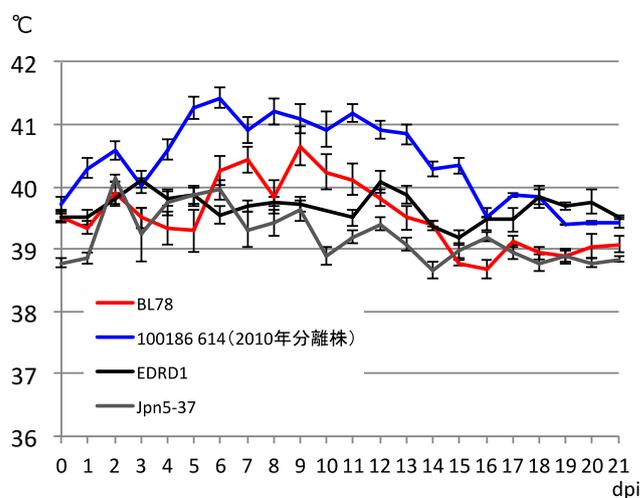


図 4 HP-PRRSVおよび国内分離株を接種した離乳豚の体温 (直腸温)

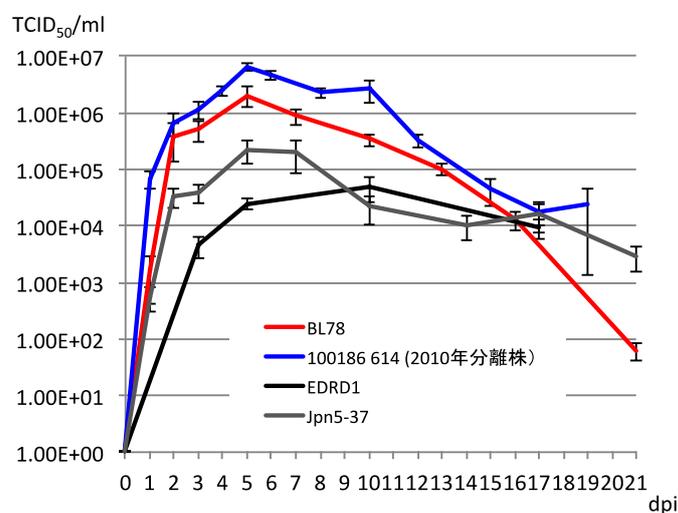


図 5 血清中のウイルスRNA量

実施課題 (1) - 2 HP-PRRSVおよび豚コレラウイルス (CSFV) のゲノム解読と疾病関連遺伝子群の特徴の調査

・ PRRSVの次世代シーケンサーを用いたゲノム全長解読手法の開発

ショ糖密度勾配遠心法で精製された北米型ウイルス国内標準株 (EDRD-1) のゲノムRNAを鋳型として解読を行ったところ、86%以上のリードがEDRD-1参照配列にマッピングされた。また、国内分離株の培養上清及びHP-PRRSV感染実験豚のウイルス血症を認めた血液由来のRNAサンプルでも問題なく全ゲノム解読が可能であることも確認した。さらに、野外での流行株の解読を行うために、感染豚の血清および肺乳剤から抽出した検体でも解読が可能であることを確認した。また参照配列へのマッピングではなく、SPAdesソフトウェアを用いたde novoアセンブルによるゲノム配列再構成も可能であることを確認し、国内標準株等の配列と大きく異なる場合でも検討が可能であることを示した。

さらにベトナムでの流行株の解読を行い、これまでに単離された株との相同性を検討したところ、二つの株に大別された。一つ（HP4）は、中国のHP-PRRSV標準株JXA1と類縁の、ベトナムでの過去の単離株Hanvet1.vn（KU84720）と極めて高い相同性（≒99%）を示し、もう一つは別の中国単離株GX09-32（HM214915）と極めて高い相同性（≒99%）を示した。GX09-32は別の過去のベトナム単離株SRV07（JX512910）と高い相同性を示すことから、本解読手法がベトナム流行株の亜集団検出に有効であることが示された（図1）。

また、公的データベースに登録されている北米型PRRSV489株のアラインメントにより、高病原性株に特徴的とされる30アミノ酸欠失領域の下流に、高病原性株において変異型が頻出する領域が検出された（図2）。

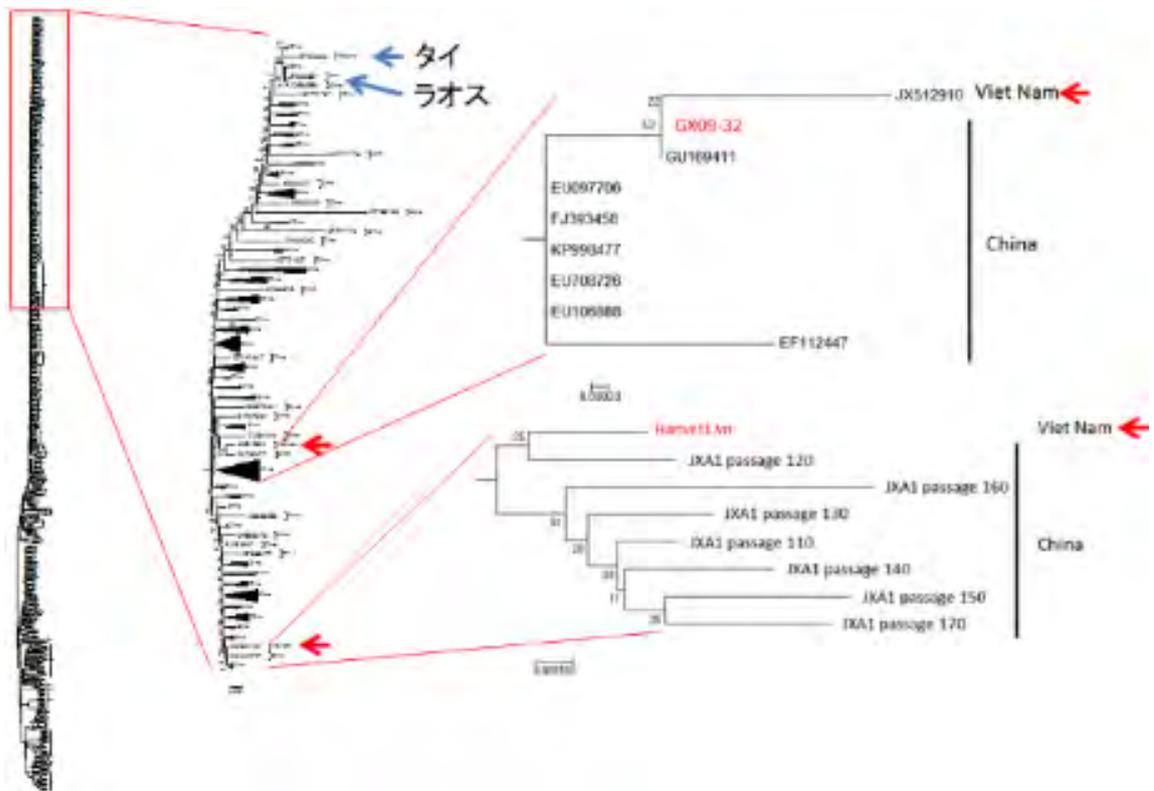


図1 全長を解読したベトナム野外株の系統樹上での位置

今回解読した配列は矢印で示した配列と高い相同性を示した。公的データベース（GenBank）に登録されているおよそ600株のとの比較解析に基づく。

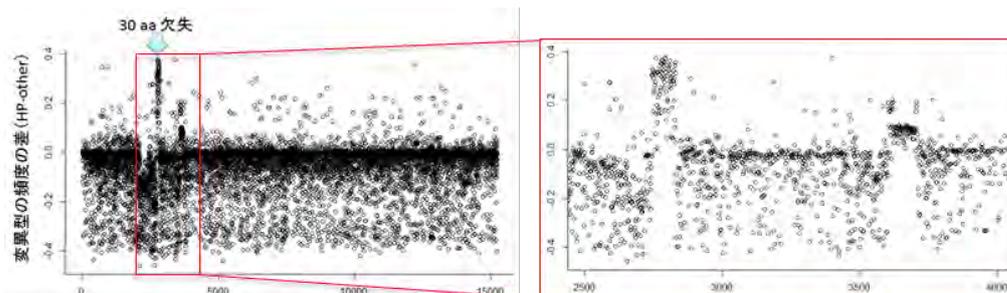


図2 データベースに登録されているPRRSVにおいて、高病原性に特徴的に見られる塩基置換の位置

これまでに知られている30アミノ酸の欠失をもたらす変異のおよそ1kb下流に別の変異頻出領域が存在することを確認した。

・CSFVのゲノム全長解読手法の開発

公的データベース (GenBank) に登録されているCSFVゲノム全長配列63株をアラインメントし、保存領域の抽出を行い、およそ1kb毎に逆転写プライマーの設計を行った。本プライマーを用い、PRRSVゲノム解読の手法と同様に、逆転写、DNA産物の増幅、次世代シーケンサー (ionPGM) を用いた配列解読をGPE(-)株を用いて行ったところ、塩基を1リード以上でカバーしている領域は全体の93%に達し、ほぼ全長を解読することができた (図3左)。

さらに、ベトナムで採取された野外株についても同様の手法で解読を行ったところ、高いものでは全体で85%、CDSに限定すると88%についてゲノム領域を1リード以上カバーしており、ウイルス亜集団の検出のために活用可能であることが示された (図3右)。

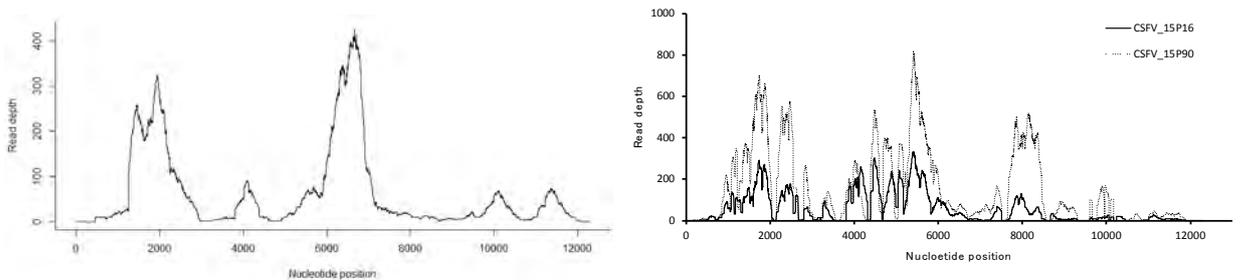


図3 CSFVゲノム全長配列解読結果

参照配列 (D49533.1) にマッピングされたリード数として示す。左はGPE(-)株の解読結果を、右はベトナム野外株で得られた解読結果の内の代表的なものを示す。

さらに、解読結果を用いたSPAdesソフトウェアによるde novoアセンブルの結果、4kb以上のコンティグの生成されたものについて、GPE(-)株の1010~5223bp領域に相当する配列を、これまでに全長が解読されたCSFVゲノム配列と比較した結果、今回のベトナム野外流行株は中国最南部 (湖南省及び広西壮族自治区) で検出された株と同一のクレードに位置づけられることが明らかとなった (図4)。

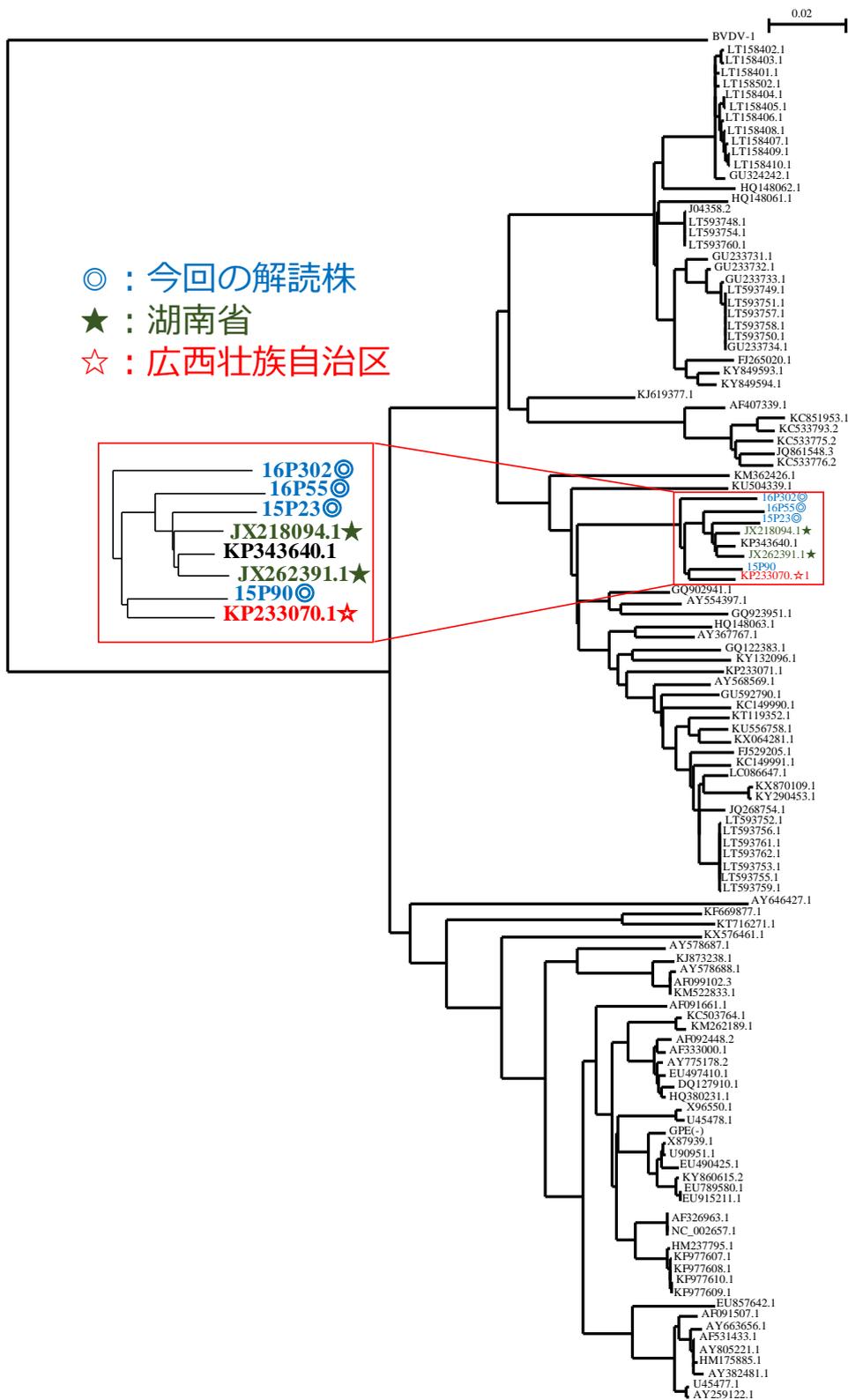


図4 ベトナム野外流行株の他のCSFVゲノムとの比較
 牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）をアウトグループとしてNJ法により系統樹を作成した。

実施課題（１）－３ HP-PRRSおよびCSFV流行実態解明と病原性解析

・ PRRSVおよびCSFVの浸潤状況

タイ国にて26年度18農場99検体、27年度22農場80検体の野外サンプルを収集し、流行している豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）およびCSFVを解析した。PRRSVのORF5の塩基配列を解析したところ、欧州型および北米型ともに複数の遺伝学的グループが検出された。global PRRS classification systems (Stadejek et al., 2008; Shi et al., 2010, Choi et al. 2014)により、これまでのタイのPRRSV欧州型はClade A, D, Hに分類され、2016年2株はClade A、2016年2株はClade Hに分類された。PRRSV北米型については、L1-9 lineageに分類され、タイの検出株はこれまでL1, L5, L8およびorphan lineage（タイローカル株群）に分類されており、2015年7株はL1 lineage、2016年4株はorphan lineageに分類された。検出されたPRRSV北米型サンプルにHP-PRRSVは含まれなかった。CSFVは遺伝学的に3つのグループに大別され、1980年～1995年は遺伝型1と3、近年は2型が流行し、検出されたウイルスも2.1型に属していた。

・ 流行株に対するCSFVワクチンの評価

保存CSFV遺伝型1.1および3.3を用いて、臨床症状およびウイルス血症を確認し、感染試験を確立した。CSFVの遺伝型1.1および3.3について $10^{5.6}$ /TCID₅₀の力価の接種液を作製し、CSFV抗体非感染豚に接種して感染試験を実施した。ウイルス接種群はCSFVの特徴症状；沈うつ、食欲廃絶、振戦、発熱（平均40.5℃以上）を示した。また、末梢血白血球数は5000-6000/mm³に減数した。

流行地より材料を得て（CSFVの2.1型）、ウイルス接種液を作製（予備試験接種豚全血[10^6 TCID₅₀/ml]を培地で1/10に希釈）し、SPF豚14頭を3群に分け（1群：Vac+CSFV +、2群：Vac-CSFV+、3群：Vac+CSFV-）、ワクチン（ 10^3 TCID₅₀ Hog Cholera virus GPE- strain (Batch:112, Mfd 05.2016; Product of Intervet International b.v. Boxmeer, Holland; Matsuken Pharmaceutical Industry Co. Ltd, Tokyo) 投与2週間後にCSFV（ 10^5 TCID₅₀/ml）を筋肉内接種し、臨床症状、ウイルス血症及び解剖検査をして比較した。なお、GPE(-)株と遺伝型2.1cの遺伝子の一致率は84.3%である。攻撃対照（2群）では発熱、食欲不振および白血球減少、ウイルス血症が認められ、また解剖及び組織検査でCSFVに典型的な病変が認められるのに対し、ワクチン投与攻撃群（1群）では、臨床症状、白血球減少、ウイルス血症および解剖時に病変が認められなかった（図1、2、表1）。以上のことから、タイ国で近年流行するCSFV株の病原性を明らかにし、日本国で使用されるCSFVワクチンGPE(-)株と同じワクチン株が、近年のアジア各国で流行するCSFV株（遺伝型2.1）に対して、臨床症状、ウイルス血症および病変形成を抑制することを明らかにした。



図1 CSFV攻撃後5日において、1群（Vac+CSFV+）では無症状であるが、2群（Vac-CSFV+）は食欲不振が見られる。

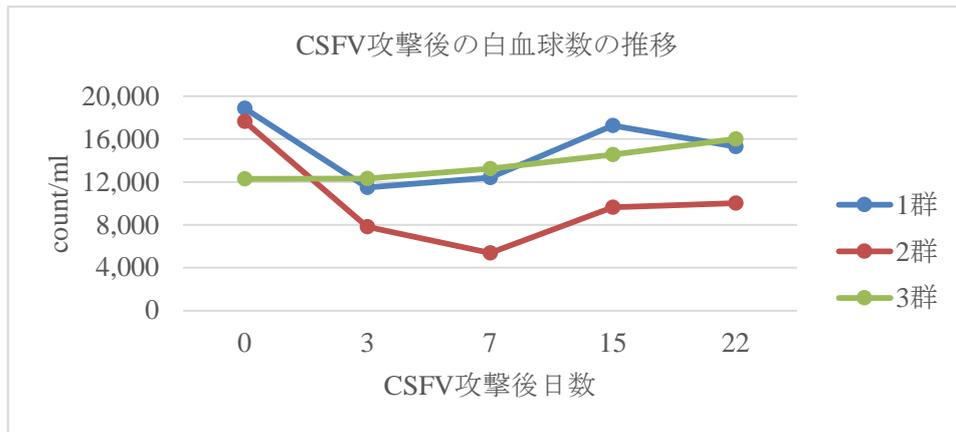


図2 CSFV攻撃後の白血球数の推移

表1 ウイルス攻撃後のウイルス血症値 (Ct値)

	ウイルス攻撃日数					解剖日
	0	3	7	14	22	
1群	0	0	0	0	0	0
2群	0	0	31-33	31-33	ND	28-35
3群	0	0	0	0	0	0

リアルタイムPCRで計測した血液中CSFV遺伝子量

1群 : Vac+CSFV +、2群 : Vac-CSFV+、3群 : Vac+CSFV-、ND : 未実施

・PRRSおよびCSFの血清疫学調査

ベトナムにおけるPRRSおよびCSFの浸潤状況を調べるためベトナム国内の18農場、270検体（1農場、離乳豚から肥育豚を10頭、母豚を5頭）の血清を用いてELISAによる抗体検査を実施したところ、15農場の132検体からPRRSV抗体が、全農場の178検体からCSFV抗体が検出された（表2）。PRRSV抗体においては、離乳豚から肥育豚で180検体中71頭、母豚で90検体中61頭が陽性であった。一方、CSFV抗体においては離乳豚から肥育豚で180検体中108頭、母豚で90検体中70頭が陽性であった。

表2 野外検体のPRRSおよびCSF抗体保有数

	PRRS		CSF	
	離乳豚から肥育豚	母豚	離乳豚から肥育豚	母豚
陽性頭数	71	61	108	70

・ベトナムおよびカンボジアで検出されたHP-PRRSVのopen reading frame (ORF) 5遺伝子の分子系統樹解析およびnon structure protein (nsp) 2遺伝子の比較

共同研究機関であるベトナム農業農村開発省動物衛生局、ベトナム国立獣医診療センターより提供された、および、カンボジアでのHP-PRRS発生検体より得たORF5遺伝子の塩基配列をもとに分子系統樹を作成したところ、二つのgeno-groupに分かれた。Geno-group A (JXA-1 like) は、2007年に流行した株と2010年以降の一部のウイルス株から、一方、geno-type B (SX09-like) は2010年以降のほとんどの株から構成されていた（図3）。また、Geno-group

Bは、遺伝的多様性が増しており、今後、病原性の変化が予想される。

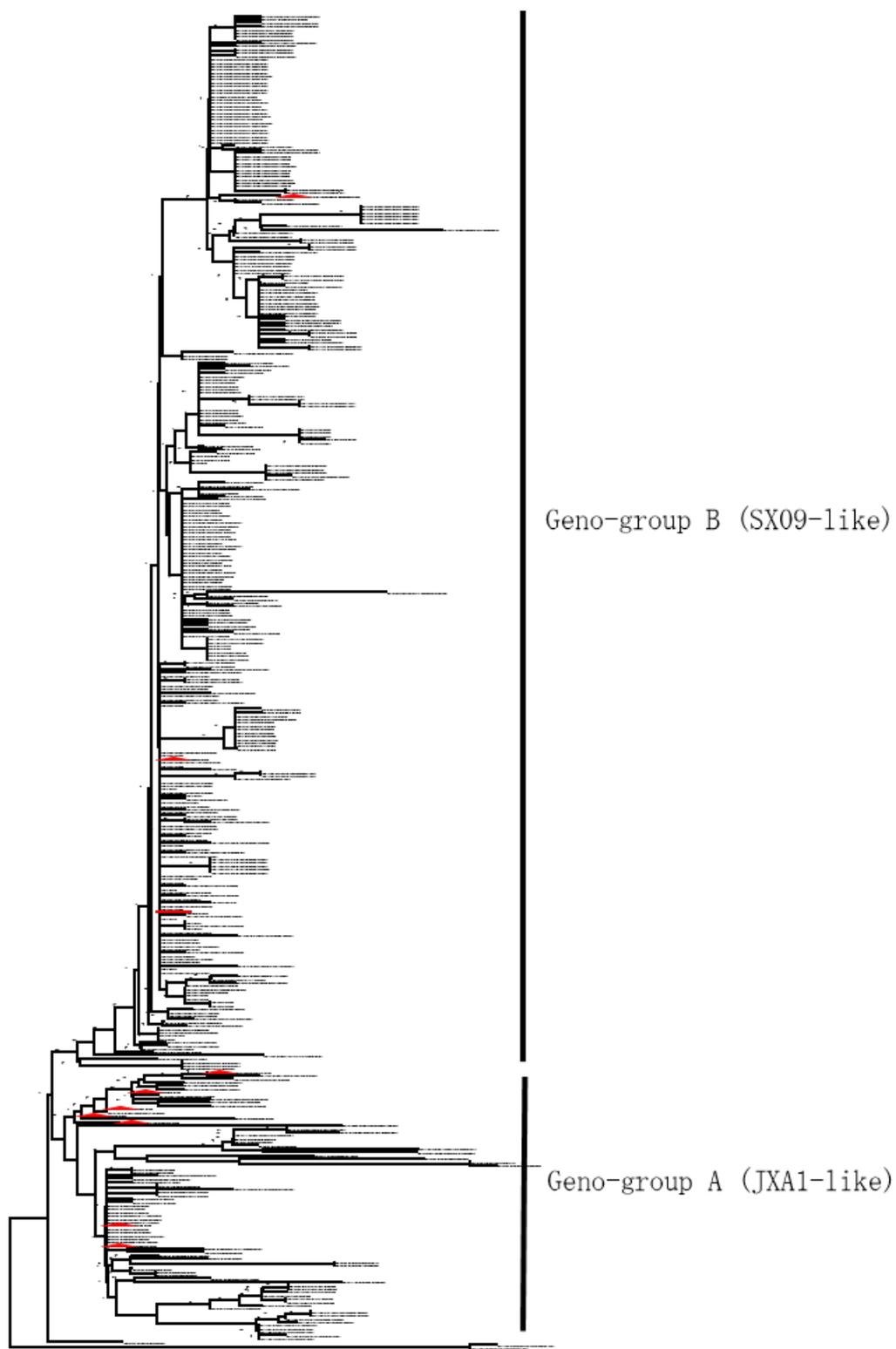


図3 2007年から2010年におけるベトナムおよびカンボジアで検出されたHP-PRRSVのORF遺伝子に基づく分子系統樹解析

また、ベトナムにおいて2012年、およびカンボジアにおいて2015年にPRRSと検出された株は既知のHP-PRRSの遺伝子診断法では検出されなかったが、nsp2遺伝子配列を決定したとこ

ろ、プローブおよびプライマー内の配列が変異していることが明らかとなった（図4）。2012年のベトナム株ではPRRS-CN FW（フォワードプライマー）内に1塩基およびPRRS-CN Probe（プローブ）内に2塩基、またカンボジア株ではプローブ内に2塩基およびPRRS-CN RV（リバースプライマー）内に2塩基の変異が確認された。いずれかの変異によって反応が阻害されて検出できなかったと考えられる。PRRSVは遺伝子の変異頻度が高いことが知られており、常にウイルス遺伝子情報を得ることで診断に用いるプライマーなどを更新する必要がある。

プライマー&プローブ	PRRS-CN FW PRRS-CN Probe PRRS-CN RV	CCCAAGCTGACACCTTTG CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT	CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT	ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT
Geno-group 標準株	JXA1 SX2009	CCCAAGCTGACACCTTTG CCCAAGCTGACACCTTTG	CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA	ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT
ベトナム株 (2010-2011年)	NCVD P1343 (2010) R3-1121 (2011)	CCCAAGCTGACACCTTTG CCCAAGCTGACACCTTTG	CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA	ACCCAGGATGAGCCTCTGGATT ACCCAGGATGAGCCTCTAGATT
ベトナム株 (2012年)	R6-18 (2012)	CCCAAGCTGACGCTTTG	CGCGTAGAATATGACAACAACGCTGA	ACCCAGGATGAGCCTCTAGATT
カンボジア株 (2015年)	Cambodia (2015)	CCCAAGCTGACACCTTTG	CGCGTAGAACTATGACAACAATGTTGA	ACCCAGGATGAGCCTCTAGATC

図4 東南アジアにおいて使用されているリアルタイム PCR (TaqMan 法) 診断法に用いるプライマーおよびプローブ内の変異

赤字は変異箇所を示す。FWはフォワードプライマー、RVはリバースプライマー、Probeはプローブを示す。

(2) HP-PRRS および CSF の診断法の高度化

実施課題 (2) - 1 CSF の簡易診断法の開発

フラビウイルス科ペスチウイルス属の4種のウイルス (CSFV、牛ウイルス性下痢ウイルス1型: BVDV-1、同2型: BVDV-2およびボーダー病ウイルス: BDV) について1株 (BVDV-1: Nose株、BVDV-2: KZ-91CP株、BDV: FNK2012株、CSFV: GPE(-)株) をずつ選抜した。次に、主要な表面糖蛋白質であるE2の遺伝子をバキュロウイルス遺伝子およびプラスミドに組み込み、昆虫細胞および大腸菌発現系による組換えE2蛋白質 (rE2) を作出した (図1)。続いて、豚に各ペスチウイルスを接種し、BVDV-1、BVDV-2、BDVおよびCSFVの各ウイルスに対する感染血清 (抗血清) を得た。これらの抗血清はそれぞれ接種したウイルスに対する中和抗体価は抗Noseが64~128倍、抗KZ-91CPが8~16倍、抗FNK2012が256~512倍および抗GPE(-)株が128~256倍であった。また、これらの抗血清の他種のウイルスに対する交差中和抗体価はいずれも2倍以下となった。さらに、これらの抗血清を用いた蛍光抗体法 (図2) やウェスタンブロット法 (WB、図3) により、rE2蛋白質およびrE^{rns}蛋白質がそれぞれホモのウイルスに対して最も強い反応性を持つこと、さらにrE^{rns}蛋白質を用いた抗体検出ELISAを構築し、抗CSFV豚血清に対する特異反応を確認した (図4)。

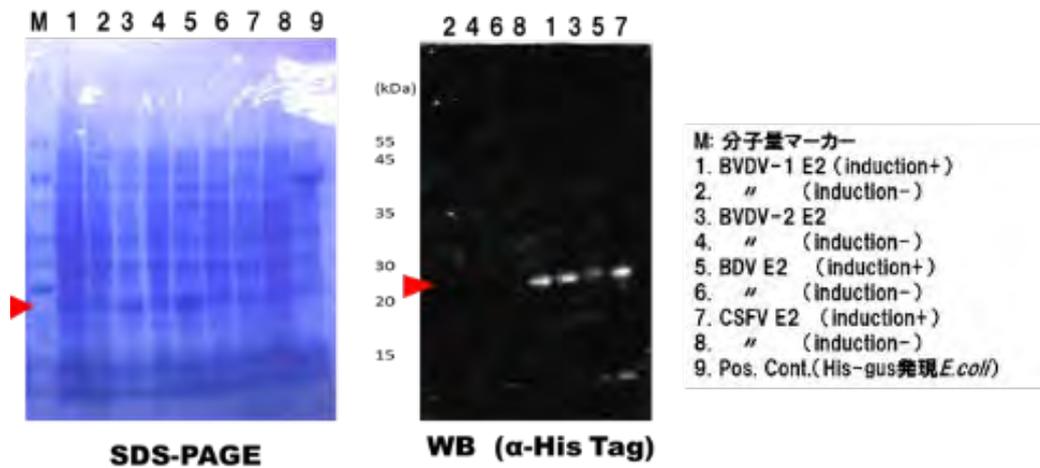


図1 大腸菌系における組換えE2蛋白質の発現

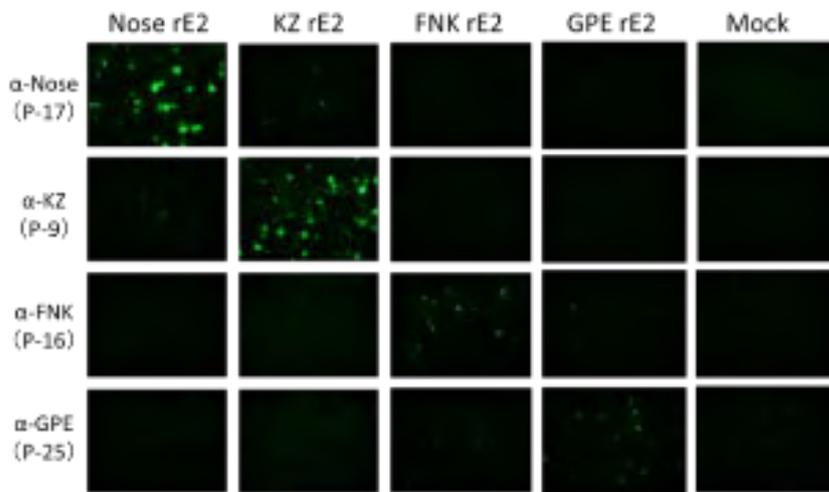


図2 抗ペストウイルス豚血清とrE2を発現する昆虫細胞との蛍光抗体法を用いた交差反応性確認試験

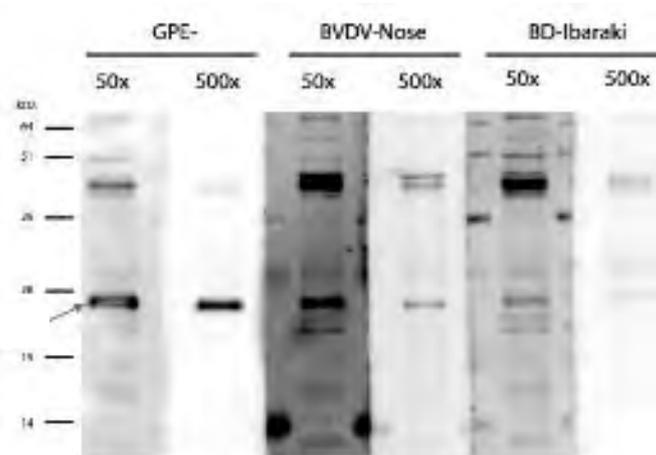


図3 CSFV由来rE^{ns} (矢印) を用いた交差反応性の確認試験

抗BVDVおよび抗BDV豚血清と比較して、ホモである抗CSFV (GPE-株) 豚血清を用いた際の反応性が最も高い。

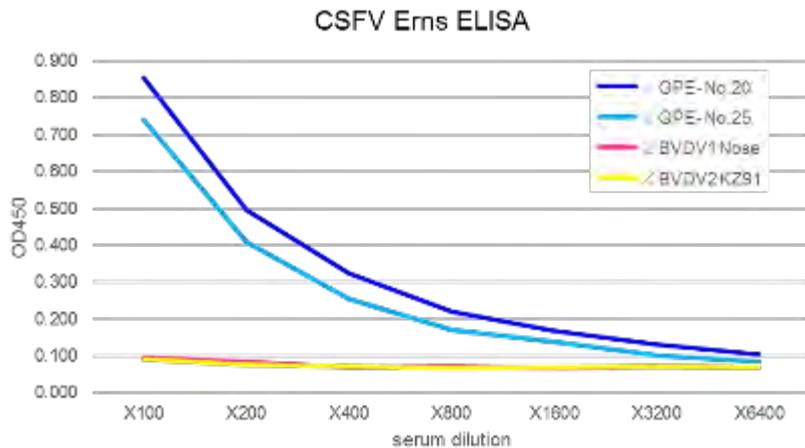


図4 rE^{rns}を用いて構築した抗体検出ELISA系の反応曲線
抗CSFV (GPE(-)株) 豚血清に対して特異的に反応することが確認された。

実施課題(2) - 2 HP-PRRSの簡易診断法の開発

特異抗体作製のため導入したHP-PRRSのベトナム株は2006年に分離された中国のHP-PRRSV JXA1株と同じクラスター内にあり、99.5%の相同性が認められた(図1)。さらに、JXA1株と同じNSP2の遺伝子欠損がみられたことから、本株は高病原性の遺伝子型であることを確認した(図2)。本株を分離した同じ農場の感染豚の病理学組織学的検査では、PRRSVの局在を伴うHP-PRRSに特徴的な肺胞性肺炎を確認した。また、リンパ節でも、リンパ球の壊死、アポトーシスがみられ、ウイルスもマクロファージに見られた(図3)。これらの結果より発生農場ではHP-PRRSの発生があったことが確認された。

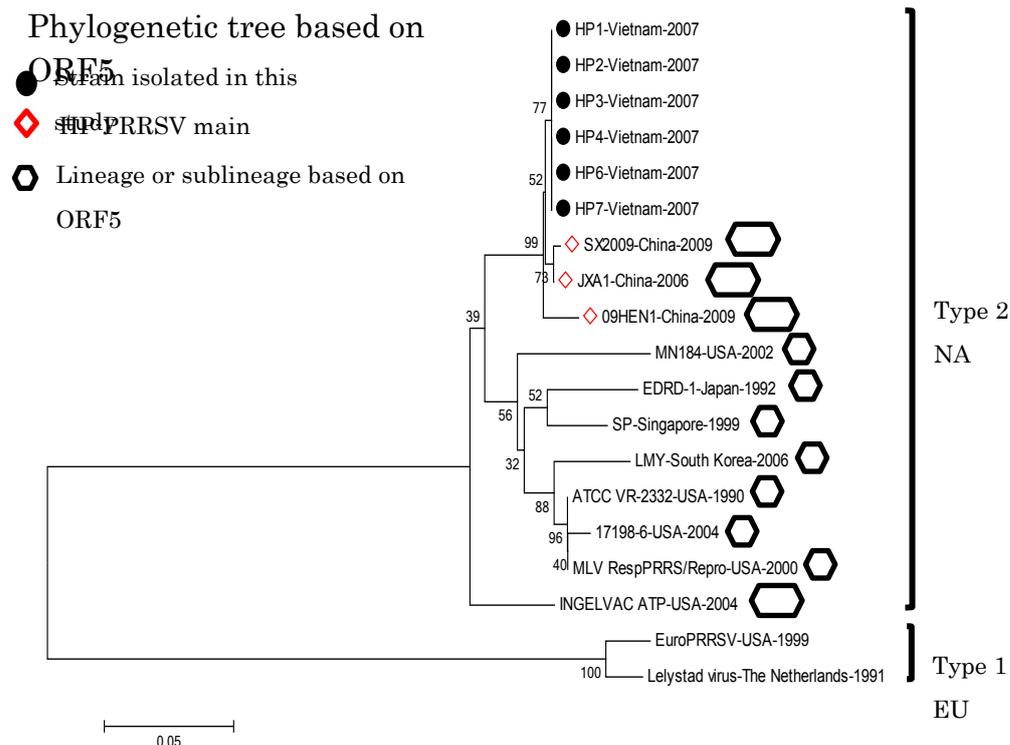


図1 本課題で使用したPRRSVの遺伝学的解析

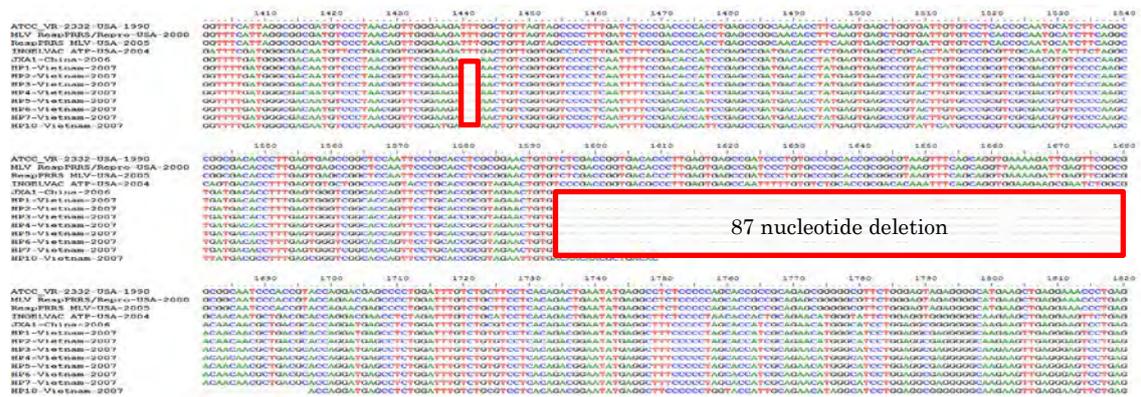


図2 nsp2の欠失部位 (90nt or 30AA)

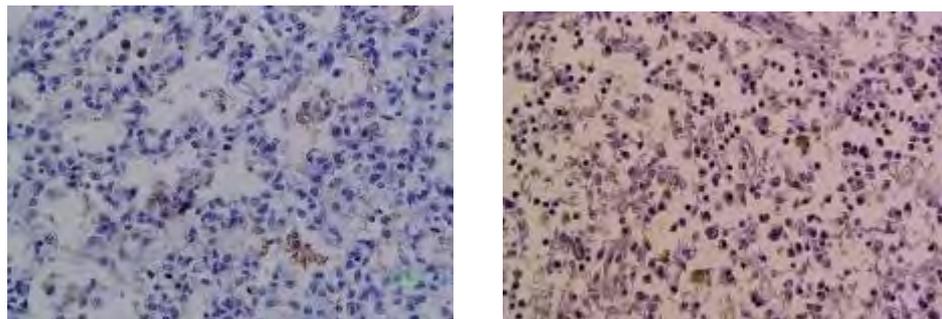


図3 HP-PRRSV感染豚における肺炎の免疫組織学的染色によるウイルス局在(左)とリンパ節におけるリンパ球消失と残存細胞におけるウイルス抗原(右)

シーケンスしたウイルス遺伝子のORF7をクローニングして組み換え蛋白を生産、精製してモノクローナル抗体用抗原を作製した。本抗原を用いて3ハイブリドーマから約20クローンが得られた。その中で、クローン3-9, 3-10, 10-7, 17-15を選択し、ウェスタンブロットにより特異性を確認した(図4、5)。それぞれのクローンを精製後作製したモノクローナル抗体を用いてクロマトキットを作製し、高病原性株および国内株のウイルス培養上清では陽性ラインを示すことを確認した(図6)。しかしながら、PCRで強反応を示したベトナム野外材料の感染豚肺の乳剤および感染豚の血清での検証では、本イムノクロマトキットでの陽性反応は見られなかった。

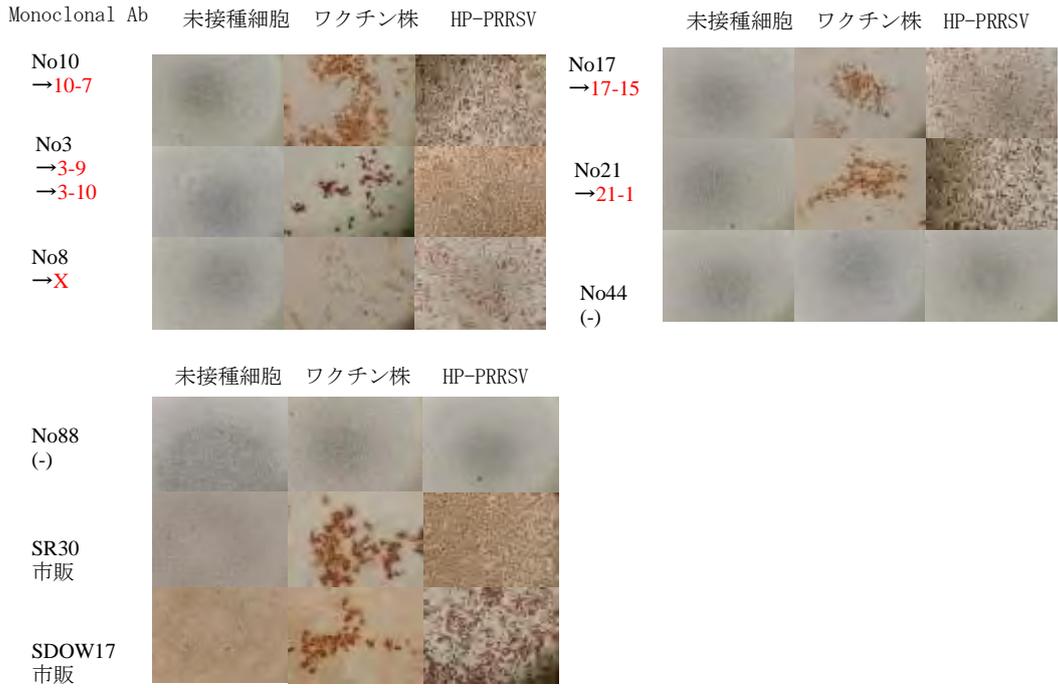


図4 PRRSV ORF7に対するモノクローナル抗体の反応性試験

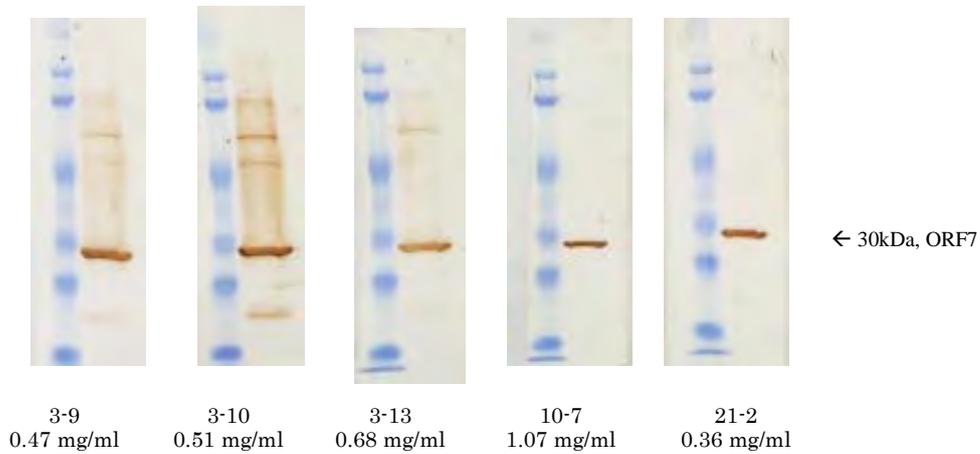


図5 ウェスタンブロッティングによる反応性試験

Ag: 0.31 mg/ml recombinant ORF7 protein, 1st Ab: Monoclonal antibody, 1:10 dilution (from supernatant)

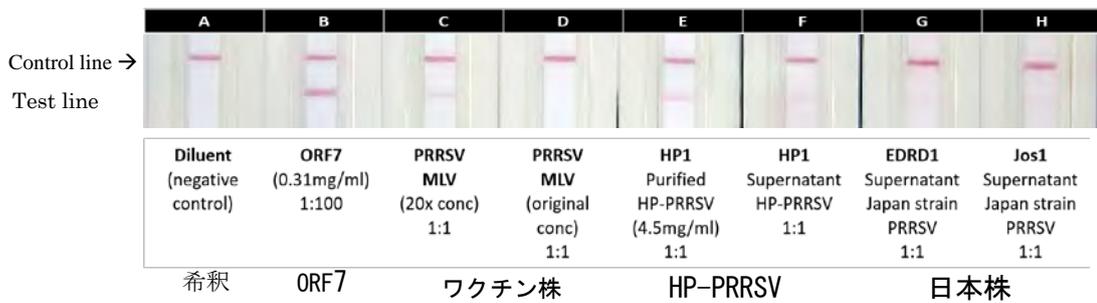


図6 Membrane antibody: Clone 3-9、Conjugate antibody: Clone 10-7の組み合わせのキットの反応

実施課題（2）－3 HP-PRRSおよびCSF診断法の有用性評価

1993～2016年に台湾で分離されたPRRSV株47株の表面糖蛋白コード領域（ORF5および7）における分子系統解析から、台湾に浸潤する株の遺伝子型はORF5では2000年以降Lineage VIIが多い一方、ORF7では2010年まではLineage IおよびVが多かったが、2010年以降はVIIが主流になっていることが明らかになった（図1、表1、2）。また、多型性に富む非構造蛋白領域（nsp2）の塩基配列の多様性解析から、既報とは異なる台湾株独自の遺伝子構造（Taiwan A-D）を持つ株が存在し、42株中の2/3に当たる28株がTaiwan Type Dであった（図2、表3）。

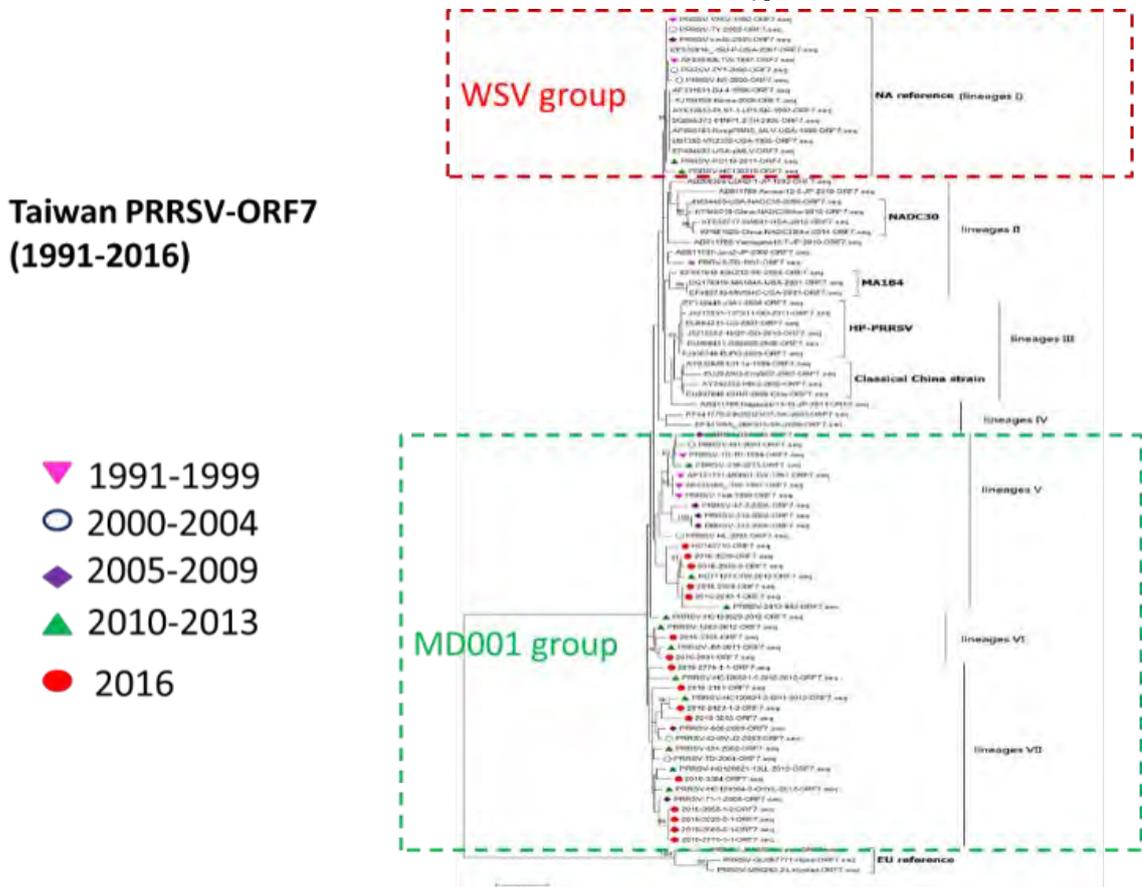


図1 PRRSV台湾分離株の分子系統樹（ORF7遺伝子）

表1 PRRSV 台湾分離株の遺伝子型の分布と変化（左：ORF5 遺伝子）

Years	WSV group		MD001 group			Total
	I	V	VI	VII	VIII	
1991-1999	3	7	0	2	0	12
2000-2004	1	1	5	7	0	14
2005-2009	8	0	8	10	2	28
2010-2013	2	0	1	7	1	11
2016	0	0	3	10	3	16
Total	14	8	17	36	6	81

表 2 PRRSV 台湾分離株の遺伝子型の分布と変化 (ORF7 遺伝子)

Years	WSV group		MD001 group			Total
	I	II	V	VI	VII	
1991-1999	2	1	4	0	0	7
2000-2004	3	0	2	0	2	7
2005-2009	1	0	4	0	2	7
2010-2013	2	0	3	3	5	13
2016	0	0	5	2	9	16
Total	8	1	18	5	18	50

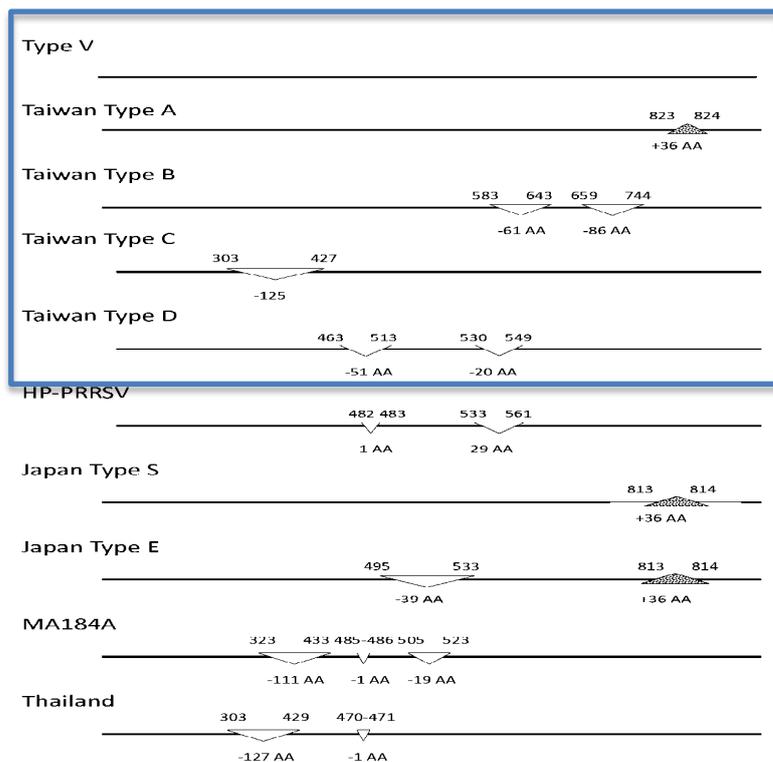


図 2 PRRSV 台湾分離株の nsp2 遺伝子領域における遺伝子構造の多様性
白抜きおよび塗りの図形がそれぞれ塩基の欠損および挿入部位を示す。

表 3 PRRSV 台湾分離株の nsp2 遺伝子構造タイプの分布および分離年

TYPE	Number of Taiwan strain	Years
Type V	4	1992-2001
Taiwan type A	6	1997-2005
Taiwan type B	3	2002-2011
Taiwan type C*	1	2005
Taiwan type D	28	2002-2016

台湾で分離された遺伝子サブグループの異なるCSFV 3株（LPC：遺伝子型1.1、TD/96：同2.1、94.4：同3.4）を無処理の豚および3種の組換えE2蛋白質で免疫した豚に接種し、6種類の抗血清を作出した。次に、これらの抗血清の交差中和抗体価を求め、同一の亜型では他のものより100倍以上の高いことを確認した（図3）。さらに、課題番号1021で作出した組換えE^{rns}蛋白質（rE^{rns}）との反応性を確認した結果、未処置（Challenge）および免疫（Vaccine）の両方で特異的なバンドを検出した（図4）。免疫した豚では非特異的なバンドも多数検出されたが、これは豚に免疫した組換え蛋白質と1021で作出したrE^{rns}がいずれもバキュロウイルス系で作出したものであったため、バキュロウイルスもしくは昆虫細胞由来の抗原およびそれに対する抗体が含まれていたものと考えられた。また、このrE^{rns}を用いて開発した抗体識別ELISA系の評価試験についても実施したが、時間的に十分な条件検討ができず、現時点では有効なデータは得られていない。

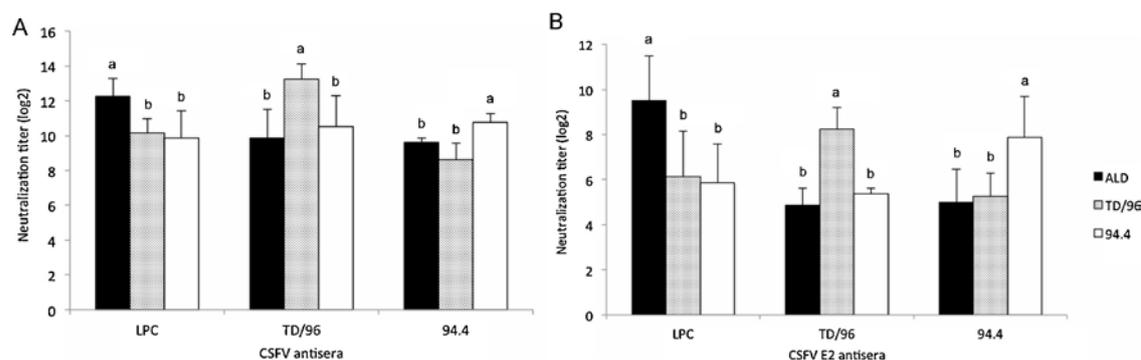


図3 実験感染によって得たウイルス感染豚抗血清 (A) および組換え E2 蛋白質を免疫した豚から得た E2 特異的抗血清 (B) を用いた交差中和抗体価。

有意差 ($p < 0.05$) が認められた検体間には異なるアルファベット (a および b) を示した。

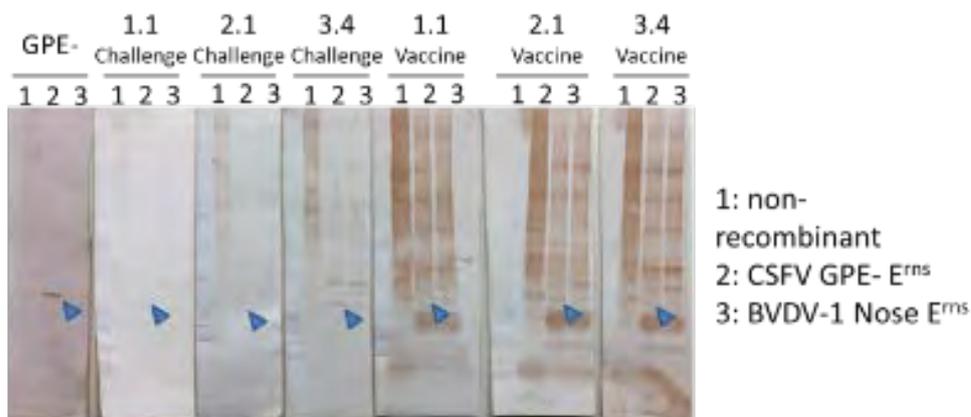


図4 課題番号1021にて作出したrErns蛋白質およびCSFV台湾株に対する抗血清を用いたWB rErns蛋白質 (矢頭) に対する反応が確認できる。

3) 成果活用における留意点

HP-PRRSVの分離株による感染実験では株により病原性が異なっていたため、現場においては今回の得られた結果と比べて異なる可能性があることに留意する必要がある。また、1) 品種、2) 飼育環境、3) その他の病原体や複合感染などにより病原性が変動することに留意する必要がある。CSFワクチンの効果検証については、GPE(-)ワクチンのみの試験であり、タイ国で使用される他のCSFワクチンとの有効性の比較は実施していないことに留意する。

CSFの簡易診断法の開発については、rErns蛋白質を用いた抗体検出ELISAは抗CSFV抗体特異的な反応を示すことを日本国内で確認したものの、台湾では上記の様な良好な結果が得られなかった。実用化には更なる検証と改善が必要である。HP-PRRSの簡易診断法の開発については、PRRSVを特異的に検出する簡易キットは作製できたが、野外材料では陽性反応を得ることができなかった。感染豚のウイルス量や検体の前処理の工夫が必要であると推察された。一方、本課題で作製された抗体はPRRSVに特異性が高く、PRRSVの研究に活用可能である。

4) 今後の課題

引き続きPRRSVの病原性を規定する因子を解明するために作製する感染性cDNAクローンを用いて検討していくとともに、東南アジアにおけるPRRSおよびCSFの流行状況と遺伝子情報の把握、ウイルス株の導入法を進展させるため、今後も各国との連携を深めていく。また、今回は主としてベトナム由来のウイルス株の解読を行ったが、他の国・地域における流行株についても同様に解読を行うことで、国・地域を越えたウイルスの浸潤状況の把握をしていくとともに、病原性を規定する新規の要因を明らかにするため、解読を行った株の病原性と照合を行う必要がある。PRRSVおよびCSFVの両者についての全ゲノム解読手法を開発したが、解読出来る領域にはゲノム中で偏りが存在し、サンプルの状況によっては解読が困難な領域も存在した。逆転写プライマーについては、最新のゲノム配列を収集しアップデートすることによる汎用性のさらなる向上も必要であると考えられる。ワクチン評価試験で使用したタイ国流行株（CSFVの2.1型）は、感染試験で高熱を示さない等、これまでのCSFV強毒株とは異なる病勢も認められたことから、全ゲノム配列の解析等、さらなる解析が必要と思われる。また、アジアにおけるHP-PRRSVについては、診断に用いるプライマーおよびプローブの更新が必要となること、ウイルスの病原性が変化する可能性のあることから、引き続き遺伝子情報の入手およびHP-PRRSVの病原性を確認し、我が国への侵入、まん延防止に向けてアジアにおける疾病の流行実態を調査する必要がある。

CSFの簡易診断法の開発については、日本と台湾で反応が異なった原因の解明および安定的な反応性のための改良を進めるとともに、野外感染血清等を用いた反応性の評価が必要である。HP-PRRSの簡易診断法の確立については、より感度の高い抗体の作製を行うとともに、検出感度をあげるための条件を検討する。いずれの疾病にうついても、台湾家畜衛生研究所および農研機構・動物衛生研究部門との間の研究継続と本試験に用いた抗血清の相互利用を進める。

中課題番号	13406421	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	2		
中課題名	海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延防止技術の開発		
小課題名	口蹄疫の侵入・まん延防止技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	山川睦・農研機構動物衛生研究部門		

1) 研究目的

口蹄疫（FMD）の制圧は、口蹄疫ウイルス（FMDV）の強い感染力や宿主域の広さに加えて、ウイルス遺伝子の変異しやすいため困難である。ウイルス遺伝子の変異は、従来の遺伝子診断法による摘発を困難にするとともに、抗原性の変異によるワクチン効果の減弱をもたらす。そのため、ウイルスの感染動物における変異様式の解析は、高精度な診断法や有効なワクチンの開発に必須である。そこで近年東アジアで流行しているウイルスを用いて、同種および異種動物間の感染試験を行い、ウイルス伝播の有無や感染動物におけるウイルスの抗原性や遺伝子の変化とともに、ウイルスの病原性を明らかにする。また、FMDワクチンを接種後にウイルスが感染した場合の感染性、病原性、体内のウイルス動態の解析や非構造蛋白に対する抗体の産生時期や検出感度そして持続感染（キャリア）の成立の有無について明らかにする。

一方、FMD流行時の異なる時期、場所、動物種におけるウイルスの遺伝子及び抗原性比較解析から、流行の時間枠中におけるFMDVの変異の動態や多様性を解明するとともに、より保存性の高い遺伝子領域を用いた遺伝子診断法を開発する。また、発生早期にウイルスを分離してワクチンの使用など防疫対策の方針を迅速に決定する必要があることから、より分離効率の高い細胞培養系を確立する。さらに、家畜防疫の際に用いられている各種消毒用資材ならびに開発中の資材について種々の環境下におけるFMDVに対する消毒効果を検証し、有効な消毒方法を確立する。併せて、自然環境下におけるFMDVの存続について検証する。

国内でFMDが発生した際に分離された、低病原性を示す0/JPN/2000株（2000年分離株）と典型的な病原性や感染力を示す0/JPN/2010株（2020年分離株）を用い、病原性を規定する遺伝子の探索や、感染・増殖の分子基盤の解析に必要な感染性cDNAを構築する。両株の遺伝子組換えウイルス（キメラウイルス）を作出し、比較解析することにより、新たな抗ウイルス剤やワクチンの開発が可能となる。また、プラス鎖およびマイナス鎖RNA特異的RT-PCR法（RNA鎖特異RT-PCR）の開発、それを用いた感染細胞中における遺伝子量の解析により、宿主細胞内におけるウイルス増殖のメカニズムを解析する。

2) 研究成果

実施課題（1） FMDVの感染伝播様式の解析

FMDV 0/JPN/2010株を豚の鼻腔内および口腔内に接種し、経時的に臨床症状観察と材料採取を行い、ウイルス排泄および抗体価の推移を検査した。その結果、FMDV0/JPN/2010株を豚の

鼻腔内および口腔内に接種することにより、水疱形成、ウイルス遺伝子やウイルスおよび抗体が確認された。鼻腔内接種よりも口腔内接種の方が低力価のウイルスで感染した（表1）。

表1 FMDVの鼻腔内および口腔内接種による感染状況

接種ウイルス 力価 (χ TCID ₅₀)	鼻腔内接種		口腔内接種	
	感染頭数	感染成立日	感染頭数	感染成立日
10 ³	0/3頭	成立せず	3/3頭	6~8日後
10 ⁶	3/3頭	2~3日後	4/4頭	1~2日後

ワクチン投与豚に対し、免疫3または30日後にFMDV 0/JPN/2010株を接種した。1か月間飼育後、24種類の全身諸臓器を採取し、ウイルス分離を行った。その結果、ワクチン投与後にウイルスを接種した豚はウイルス接種1~8日後にかけてウイルスを排泄したが（表2）、試験終了時（ウイルス接種約1か月後）に全身諸臓器からウイルスは分離されず、持続感染状態にはならなかった。

下記の組合せで、0/JPN/2010株をウイルス接種動物に接種し、その後同居動物とともに同室で飼育した。これらの動物について、経時的に臨床症状観察と材料採取を行い、ウイルス排泄および抗体価の推移を検査した。

- ①ウイルス接種動物：牛2頭、同居動物：山羊4頭
- ②ウイルス接種動物：牛2頭、同居動物：豚4頭
- ③ウイルス接種動物：山羊2頭、同居動物：牛2頭
- ④ウイルス接種動物：山羊2頭、同居動物：豚4頭
- ⑤ウイルス接種動物：豚2頭、同居動物：牛2頭
- ⑥ウイルス接種動物：豚2頭、同居動物：山羊4頭

その結果、同居動物として、山羊や牛は豚よりも同居感染の成立率が高く、中和抗体が早期に検出され、ウイルスへの感受性は山羊 \geq 牛 $>$ 豚という傾向であると推測された。また、ウイルス接種動物として、豚は牛や山羊よりも同居感染の成立率が高く、ウイルス排泄量は豚 $>$ 牛 $>$ 山羊という傾向であると推測された（表3）。

表2 ワクチン非投与および投与豚におけるウイルスの検出状況

ワクチン投与	ウイルス検出期間		
	血清	唾液	鼻汁
ウイルス接種30日前	2日後	1~7日後	1~6日後
ウイルス接種3日前	2~14日後	1~21日後	1~18日後
非投与	1~5日後	1~11日後	1~11日後

表3 同種・異種動物間の感染試験における水平伝播状況

試験設定	ウイルス 接種動物	同居動物	同居感染 成立率	同居動物の 中和抗体検出日
同種動物間の感染試験	牛	牛	100%(2/2頭)	6.0
	山羊	山羊	100%(2/2頭)	7.5
	豚	豚	100%(4/4頭)	4.0
異種動物間の感染試験	牛	山羊	75%(3/4頭)	6.3
	牛	豚	75%(3/4頭)	7.3
	山羊	牛	50%(1/2頭)	9.0
	山羊	豚	0%(0/4頭)	検出されず
	豚	牛	100%(2/2頭)	8.5
	豚	山羊	100%(4/4頭)	7.3

0/MOG/2017株を牛、山羊および豚に接種し、その後同居動物とともに同室で飼育した。経時的に臨床症状観察と材料採取を行い、ウイルス排泄および抗体価の推移を検査した(図1)。その結果、全てのウイルス接種動物および同居動物が典型的なFMDの臨床症状を示した。ウイルス接種豚および同居豚は持続感染状態にはならなかった。

これまでの感染試験で得られた材料やウイルスの全長ゲノム配列を決定した。その結果、69検体の材料およびウイルスの全長ゲノムを比較したところ、コンセンサス配列に顕著な違いは確認されなかった。



図1 0/MOG/2017株接種動物における病変 (A: 牛の蹄、B: 山羊の口唇、C: 豚の鼻)

実施課題(2) FMD流行時のウイルス動態の解析とまん延防止技術の高度化

FMDV分離効率の高い細胞としてLFBK- $\alpha\beta$ 6細胞を米国より導入し、既存の細胞系と感度を比較した。LFBK- $\alpha\beta$ 6細胞は、既存の株化細胞のうち、FMDVに最も高い感受性を有すると考えられるZZ-R 127細胞とほぼ同様の分離率を示した。

ワクチン免疫牛および豚に対し、免疫3日または30日後に0/JPN/2010株を接種した。経時的に臨床症状観察とサンプル採取を行い、ウイルス排泄および抗体価の推移を検査した。ワクチン免疫牛では水疱形成が低減し、ウイルス排泄期間が短縮された。豚へのワクチン接種は水疱形成を抑えたが、ウイルス排泄期間は抑えなかった(表1)。

表 1 ワクチン投与豚へのFMD感染試験

		ウイルス接種後日数				
		1	2	3	4	7
ワクチン非投与豚 (n=4)	症状	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	ウイルス排泄	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4
ワクチン30日免疫豚 (n=3)	症状	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	ウイルス排泄	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
ワクチン3日免疫豚 (n=3)	症状	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3
	ウイルス排泄	3/3	3/3	2/3	3/3	1/3

例：症状 1/3 は3頭中1頭が症状を表したことを示す。

2010年FMD発生292症例のうち127例からウイルスを分離し、そのうち104ウイルスの塩基配列を決定した。海外のウイルスと共に系統解析した結果、2010年の宮崎での発生で侵入・蔓延したウイルスは単一であったことが確認された（図1）。また、ゲノム全長を比較した結果、104ウイルスの流行時における塩基置換率は 2.88×10^{-5} /塩基/日であり、完全に配列が一致するウイルスはなかった（図1）。牛および豚から分離したウイルスのアミノ酸全長をそれぞれ比較したが、宿主特異的置換はみられなかった。ウイルスの分離された宿主の血中ELISA価と塩基置換率には相関がないことを確認した。代表6株の中和試験の結果、これらのウイルスの抗原性に大きな差異はなかった。以上から、清浄国の家畜にはワクチンや感染による抗体の選択圧がないこと、迅速な防疫対応により発生規模を限局したことによって、2010年の発生の間にはウイルス固有のゲノム複製エラーによる塩基置換は起きたものの、ウイルス性状が大きく変化する変異は起きなかったことがわかった。

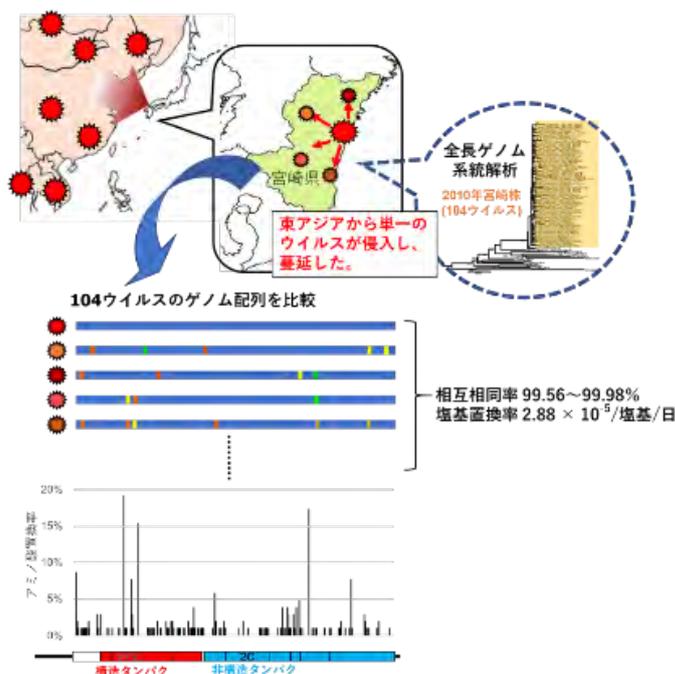


図2 ゲノム全長解析によって明らかになった2010年日本での短期間流行におけるFMDVの遺伝子変異

各アミノ酸の変異割合を解析したところ、流行時に変異の多いアミノ酸領域ウイルスの殻のタンパクであるVP2には変異が多く、非構造タンパクである2Cには変異が少ないことがわかった。また、今回のデータと海外株416株のゲノム全長を比較し、過去に動衛研で作製したプライマー-FM8/9が標的とする領域は保存性が高いことを確認した。さらに、FM8/9を用いたRT-PCRは世界標準プライマー1F/Rよりも7血清型のウイルスに対し高い感度を示し、また、感染牛および豚の臨床サンプルに対してもより高い検出率を示した（表2）。

表2 FMD診断用プライマーの各ウイルス株に対する検出限界

ウイルス株	検出限界		ウイルス株	検出限界	
	(TCID ₅₀ /0.1ml) ^a			(TCID ₅₀ /0.1ml) ^a	
	1F/R	FM8/9		1F/R	FM8/9
O/JPN/2010	10 ⁰	10 ⁰	A/IRN/1/2011	10 ⁰	10 ⁻²
O/TUR/5/2009	10 ¹	10 ⁻¹	Asia1/TUR/2011	10 ⁰	10 ⁻²
O/MOG/4/2017	10 ¹	10 ⁻¹	C/PHI/7/1984	10 ⁻¹	10 ⁻¹
O/ECU/4/2010	10 ¹	10 ⁰	SAT1/KEN/2009	10 ³	10 ⁻¹
O/HKN/2015	10 ¹	10 ¹	SAT2/SAU/2000	10 ⁰	10 ⁰
A/TAI/2011	10 ¹	10 ¹	SAT3/ZIM/1983	10 ³ <	10 ⁻¹
A/TAI/46-1/2015	10 ¹	10 ⁰	VSV (New jersey)	ND ^b	ND
A/SAU/15/2016	10 ¹	10 ⁻²	SVDV (J1' 73)	ND	ND

実施課題（3） FMDVの感染・増殖の分子基盤の解析

マイナス鎖RNAの検出はウイルス増殖を示す指標となることが感染細胞における解析で示された。マウスでは心臓と筋肉でウイルスが高率に増殖していることが推察されたが、牛および山羊の持続感染部位については明らかにできなかった。一方、O/JPN/2010株のゲノムを数カ所の領域に分けてクローニング後、発現プラスミドベクター上で完全長cDNAとなるよう再結合した。これを細胞に導入しFMDVを実験室内で人工的に作ることに成功した（図2）。

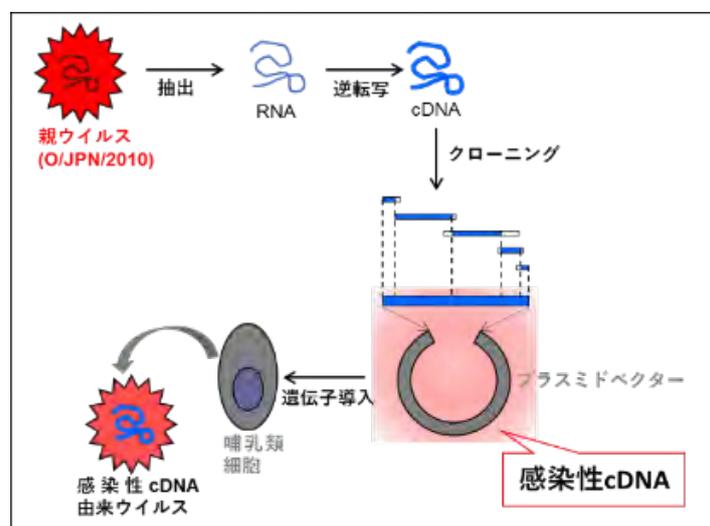


図2 2010年に日本で分離されたFMDVの感染性cDNAクローンの構築

O/JPN/2010株の完全長cDNA由来ウイルスの細胞での増殖性や抗原性、豚での病原性など生

物学的性状が親株と同様であることを確認した。(図3、表4)

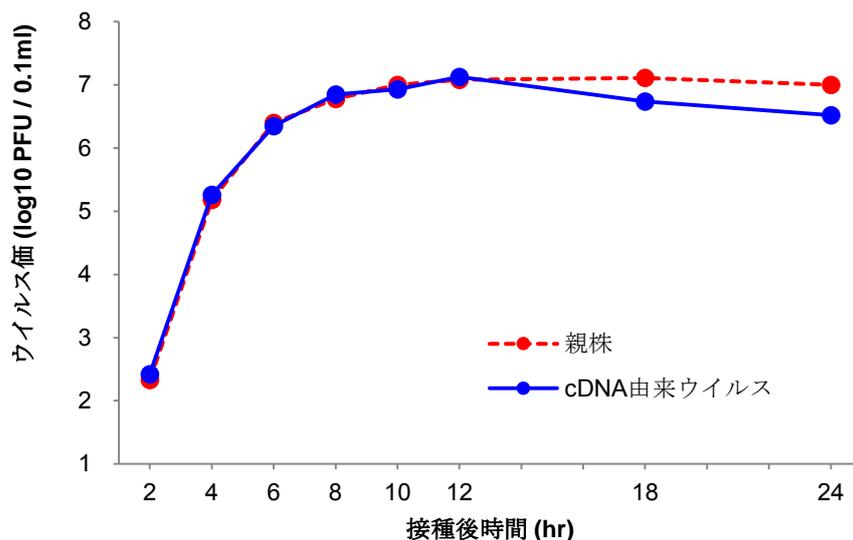


図3 豚胎仔腎株化細胞におけるウイルスの増殖性

表4 親ウイルスおよびcDNA由来ウイルスの豚に対する病原性

接種ウイルス	症状の発現	ウイルス排泄	血中抗体価
親ウイルス	1-2日	1-6日	5-14日
cDNA由来ウイルス	1-2日	1-5日	5-14日

各ウイルスを豚3頭に接種し、14日間経時的に症状を観察し材料を採取。
ウイルス接種日からの日数を記載している。

2株間で遺伝子を網羅的に組み換えたウイルスを11種類作出し、それらを導入したCos7細胞から計8ウイルスを回収した。それらの乳飲みマウスに対する病原性を解析したところ、病原性株 (0/JPN/2010) のウイルス粒子の最外殻に当たるVP1タンパクおよびRNAポリメラーゼの役割をする3Dタンパクをそれぞれ非定型的病原性株 (0/JPN/2000) のものに組み換えたウイルスは低い病原性を示した (図4)。

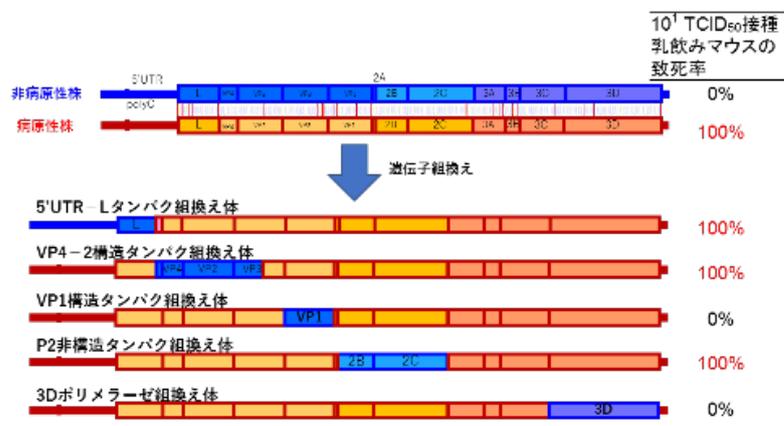


図4 病原性の異なるウイルス同士の遺伝子組換え体の性状解析

0/JPN/2010株と0/JPN/2000株では感受性細胞におけるブラック形成能に有意な差はなかったが、乳飲みマウスにおける50%致死率が大きく異なった。また、0/JPN/2000は細胞で継代するうちにヘパラン硫酸親和性で病原性の低いウイルスが優勢になるが、一方、0/JPN/2010は遺伝子と病原性が安定していることがわかり、そのようなウイルス性状の違いが病原性の差異につながったと示唆された。

実施課題（４） FMD流行時における抗ウイルス活性を有する防疫資材活用技術の高度化

FMDVに対して室温と氷上（0℃）で直接的な抗ウイルス作用を認めた消毒用資材は、銅繊維、銅繊維織込織布、銅繊維織込防鳥ネット、銀処理タオル、二酸化塩素、次亜塩素酸水、ベッセルサニー・酸性（有効成分：塩化ジデシルジメチルアンモニウム）、ベッセルサニー・アルカリ、冬季用に開発されたウインターベッセルサニー・酸性（有効成分：塩化ジデシルメチルアンモニウム・非イオン性界面活性剤）とウインターベッセルサニー・アルカリおよびドロマイト石灰と消石灰であった（表1）。

表1 各種消毒用資材のFMDVに対する抗ウイルス効果

消毒用資材	濃度・希釈 倍数	pH	25℃	0℃
銅繊維			4.25*	NT
銅繊維織込織布			≥4.50	NT
銅繊維織込防鳥ネット			≥4.50	NT
銀処理タオル			≥4.50	NT
二酸化塩素	100 ppm	5.4	≥4.50	≥4.50
次亜塩素酸水	10 ppm	5.6	≥4.50	≥4.50
ベッセルサニー・酸性	125倍	5.4	≥4.50	≥4.50
ベッセルサニー・アルカリ	100倍	12.6	≥4.50	≥4.50
ウインターベッセルサニー・酸性	2.5倍	5.4	≥4.50	≥4.50
ウインターベッセルサニー・アルカリ	16倍	12.6	≥4.50	≥4.50
ドロマイト石灰	20%	12.6	≥4.50	≥4.50
消石灰	20%	12.6	≥4.50	≥4.50
水道水		7.2	-0.25	-0.50

*：対照のウイルス価との指数差（logの指数差；値が大きいほど不活化効果が高い）

酪農学園大学の圃場の土と熟成堆肥を用いて各種消毒用資材の土壌および堆肥に散布した後の抗ウイルス効果を調べたところ、FMDVに対して効果を示したのはドロマイト石灰と消石灰であった。ドロマイト石灰は土壌散布と堆肥散布の両方で、消石灰は土壌散布で効果があった（表2）。

表2 各種消毒用資材の土壌および堆肥散布後のFMDVに対する抗ウイルス効果

消毒用資材	濃度・希釈	酪農大・土		酪農大・堆肥	
	倍数	pH	FMDV	pH	FMDV
ベッセルサニー・アルカリ	25倍	8.6	-0.50*	9.4	0.50
ウインターベッセサニー・アルカリ	4倍	9.4	-0.50	9.2	0.50
ドロマイト石灰	20%	12.6	≥5.50	12.2	≥5.50
消石灰	20%	12.4	≥5.50	11.0	1.75
水道水		7.7	-0.25	9.0	0.25

*: 対照のウイルス価との指数差 (logの指数差; 値が大きいほど不活化効果が高い)

自然環境下でのウイルス存続性を検証するため雨、雪、各種土壌および堆肥とFMDVを混合して直接作用を検証した。その結果、FMDVは酸性の雨および雪の作用で不活化された(表3)。黒土、赤土、鹿沼土、花野菜土、酪農学園大学の圃場の土および堆肥を作用させたところ、赤土と鹿沼土では生物活性を持つウイルスは検出限界以下で、黒土と酪農学園大学の土ではウイルスの感染性が99.4%以上低下した。このことから、FMDVは雨や雪に感受性が高く、圃場でも不活化される可能性の高いことが示唆された。

表3 雨、雪、各種土壌と堆肥のFMDVの感染性に及ぼす影響

液体	pH	FMDV	土壌と堆肥	pH	FMDV
雨	5.3	4.75*	黒土	5.6	2.25
雪	4.4	≥5.00	赤土	5.2	≥4.50
蒸留水	5.1	≥5.00	鹿沼土	5.2	≥4.50
水道水	7.2	0.00	花野菜土	5.8	0.75
PBS	7.4	-1.00	酪農大・土	7.7	2.75
			酪農大・堆肥	9.0	0.75

*: 対照のウイルス価との指数差 (logの指数差; 値が大きいほど不活化効果が高い)

抗ウイルス不活化機序を解明するため、各種消毒用資材、雨、雪および各種土壌とFMDVを混合し、ウイルスゲノム量をリアルタイムRT-PCRで測定して生残割合(%)を求めた。土壌についてはウイルスを混和した後、遠心して土壌と上清液に分けてウイルスゲノム量を定量した。銅繊維、銅繊維織込織布、銅繊維織込防鳥ネット、二酸化塩素、次亜塩素酸水、ベッセルサニー・アルカリ、ドロマイト石灰と消石灰はゲノムを破壊していた(表4)。雨や雪ではゲノム破壊は起きていなかった(表5)。また、土壌については花野菜土以外ではウイルスゲノムが検出されなかった。しかし、黒土では上清液中に感染性ウイルスが検出されたことから(表3)、抽出したRNA溶液中にリアルタイムRT-PCRの阻害因子が存在する可能性が示唆された。

表4 各種消毒資材作用後のFMDVゲノムの定量

消毒用資材	濃度・希釈 倍数	pH	FMDV
銅繊維			0.05*
銅繊維織込織布			1.00
銅繊維織込防鳥ネット			8.40
銀処理タオル			66.40
二酸化塩素	100 ppm	5.4	4.68
次亜塩素酸水	10 ppm	5.6	0.0
ベッセルサニー・酸性	125倍	5.4	115.24
ベッセルサニー・アルカリ	100倍	12.6	0.12
ウインターベッセルサニー・酸性	2.5倍	5.4	96.17
ウインターベッセルサニー・アルカリ	16倍	12.6	33.34
ドロマイト石灰	20%	12.6	0.0
消石灰	20%	12.6	0.0
水道水		7.2	117.91
維持培地		7.2	100.0

*: 維持培地の遺伝子量を100%としたときの相対パーセント

表5 雨、雪と各種土壌を作用させた後のFMDVのゲノムの定量

液体	pH	FMDV	土壌と堆肥	FMDV
雨	5.3	96.48*	黒土	0.00
雪	4.4	113.52	黒土・炉液	0.00
蒸留水	5.1	37.95	赤土	0.00
水道水	7.2	133.54	赤土・炉液	0.00
PBS	7.4	100.0	鹿沼土	0.00
			鹿沼土・炉液	7.23
			花野菜土・炉液	1.24
			未作用	100.0

3) 成果活用における留意点

FMDVの感染伝播様式の解析結果を防疫対策の確立や刷新に活用しつつも、個々の現場の実情に合わせて、防疫対策を適宜改変する必要がある。ウイルスの基本性状と現場の実情の両方を考慮し、より有効な防疫対策の確立を目指す必要がある。

次世代シーケンサーを用いてFMDVのゲノム全長を迅速に決定し、流行株の起源や分子疫学的特徴を把握することは、より適切な防疫対策の策定に有用である。

動衛研作製プライマーFM8/9は、FMDのPCR診断においてOIE標準プライマーよりも高い感度を持つが、病性鑑定においてはウイルス分離や抗体検査等、他の検査法と組み合わせて結果を判定する必要がある。

感染性cDNAを用いて、人為的に遺伝子を挿入・欠損させたウイルスや、性状の異なる株との間で遺伝子組換えウイルスを作出することによって、病原性や感染・増殖に関与する遺伝子

を明らかにできることが証明され、今後迅速な流行ウイルスの性状予測や新規ワクチンの開発に活用されることが期待される。

4) 今後の課題

野生動物におけるFMDVの病原性や家畜と野生動物間におけるウイルスの水平伝播状況を検証する必要がある。また、FMDVは変異しやすいため、海外の研究機関と今後も継続的に情報や研究資材を交換する必要がある。その一助として現在、タイ国の口蹄疫東南アジア地域レファレンスラボラトリーと共同研究を進めているところである。国内分離株とFMD常在国で流行している株の遺伝子解析データと比較することにより、ワクチンや感染抗体などの選択圧がウイルスの変異に及ぼす影響を解明できると期待される。

感染性cDNAより作出した組換えウイルスを用いて牛感染実験を行い、病原性、感染後のウイルス排泄および抗体応答を解析し、親株と比較する必要がある。0/JPN/2000株の感染性cDNAを構築したが、導入した細胞からウイルスが回収されなかったため、効率的なウイルス回収の条件や異なるベクターへの挿入などを検討する必要がある。

現在も開発が進められている各種防疫資材がFMDVの不活化に有効であるか否か、メーカーとの共同研究等を通じて検証していく必要がある。

中課題番号	13406421	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3		
中課題名	海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延の防止技術の開発		
小課題名	高病原性鳥インフルエンザの効果的な発生予防技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	西藤 岳彦・農研機構動物衛生研究部門		

1) 研究目的

高病原性鳥インフルエンザの発生時に緊急接種に使用可能な、省力的、かつウイルスの感染防御のための粘膜免疫を誘導できる新規ワクチンの開発を行う。また、鶏特有の免疫機構のメカニズム、粘膜免疫組織の機能を解明し、ワクチンの効果を高めるためのアジュバントを開発するほか、投与方法に伴う免疫応答のちがいを明らかにする。また、ワクチンが効果を示すまでの期間を補う、抗ウイルス剤の開発を通じて、実用的な発生予防技術を開発する。

鶏呼吸器に感染するウイルスをベクターとした新規ワクチンの開発に取り組むほか、豚において遺伝子再集合ウイルスの出現を防ぐユニバーサルワクチンの開発を行う。アジア地域における鳥及び豚インフルエンザウイルスの動態調査により、流行株を使った診断ツールを準備する。遺伝子改変鶏を用いて宿主の遺伝的背景・遺伝子応答がウイルスの病原性に及ぼす影響について解析する。

2) 研究成果

(1) 鳥インフルエンザに対する実用的な粘膜ワクチンの開発

実施課題(1)－1 鳥インフルエンザに対する点眼ワクチンの実用化

・ワクチン評価系の確立

鶏に不活化抗原を4週齢および7週齢時に2回点眼免疫し、3週間後に不活化抗原に使用したウイルスと同じA/chicken/Yamaguchi/7/2004(山口04株)で攻撃し、14日間の症状を観察するとともにウイルスの排泄量を測定した。その結果、鶏の生存率は83%であり、生存鶏からはウイルスは検出できなかったことから、抗原に用いた山口04株に対して高いワクチン効果が確認された(表1)。しかし、点眼ワクチンに使用する溶媒の検討およびアジュバント効果によるワクチン効果の増強を評価するためには、山口04株に対する防御効果が強すぎることから、ワクチンによる防御効果の低い攻撃株を選定する必要がある。そこで、抗原に用いた山口04株と抗原性の異なる2種類のウイルスA/chicken/Tien Giang/8932/2013(TG13株)およびA/chicken/Kumamoto/1-7/2014(熊本株)を、赤血球凝集阻止(HI)試験により選定し、攻撃試験を行った。その結果、50%の生存率を示し、生存鶏においてもウイルス排泄が確認されたTG13株をワクチン評価に用いる株として選別した(表1)。

表 1 抗原性の異なるウイルスでの攻撃後のワクチン効果

攻撃株	抗山口株血清 に対するHI価	攻撃後の生存率	生存鶏における ウイルス排泄率
山口04株	1280	83%	0%
TG13株	320	50%	100%
熊本14株	<10	50%	0%

・ワクチンに用いる溶媒の検討

ワクチン抗原を鶏眼窩に長く停滞させることにより、点眼による抗原の刺激を持続させることを目的として、溶液をゲル化する4種類の溶媒を候補物質として、ワクチン効果を比較した。その結果、タウリンを加えたメチルセルロースを溶媒として用いた場合が最もワクチン効果が高かった（表2）。さらに、ザイモサン(Zy)をアジュバントとして添加した場合も、タウリンを加えたメチルセルロースを溶媒として用いることにより、ワクチン効果の増強が確認された（図1）。

表 2 点眼ワクチン添加物の候補物質

物質名	性質	生存率
Gelzan CM	Na ⁺ 等の陽イオンと共存するとゲル化する	0%
ヒアルロン酸ナトリウム（鶏冠由来）	ゲル状の水溶液を作る	50%
ヒアルロン酸ナトリウム（細菌由来）	ゲル状の水溶液を作る	50%
タウリン加メチルセルロース	温度上昇によりゲル化する	100%

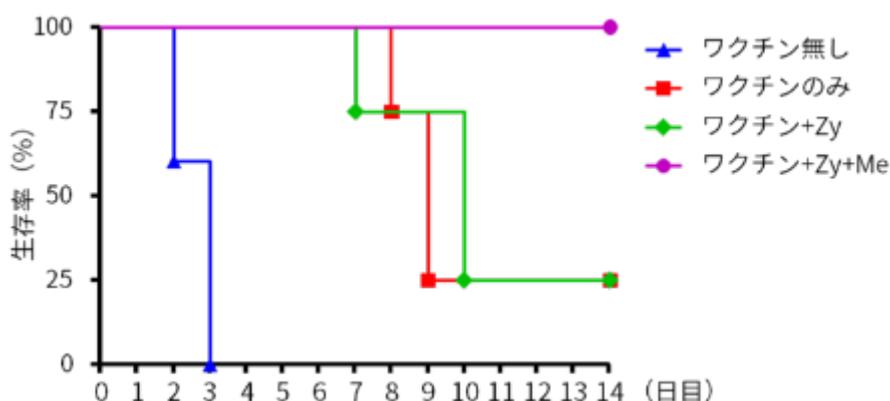


図 1 タウリン加メチルセルロース添加点眼ワクチンの生存改善効果

・アジュバントの検討

点眼ワクチンのアジュバント候補として、Zy、リポサッカライド (LPS) および2種類のCpGオリゴヌクレオチド (CpG1826およびCpG2007) を用いて、ワクチン効果の検証を行った。その結果、ZyおよびCpG2007を添加することにより、ワクチン単体投与に比べて生存率の上昇を示した（図2）。メチルセルロースの濃度を検討したところCpG2007を1μg加えた群では、ワクチンのみを接種した群に比べてHPAIV経鼻接種14日後の生存率が有意に上昇し（図3）、2

日目の気管からのウイルス排泄量はワクチンのみを接種した群に比べて有意に低下した（図4）。

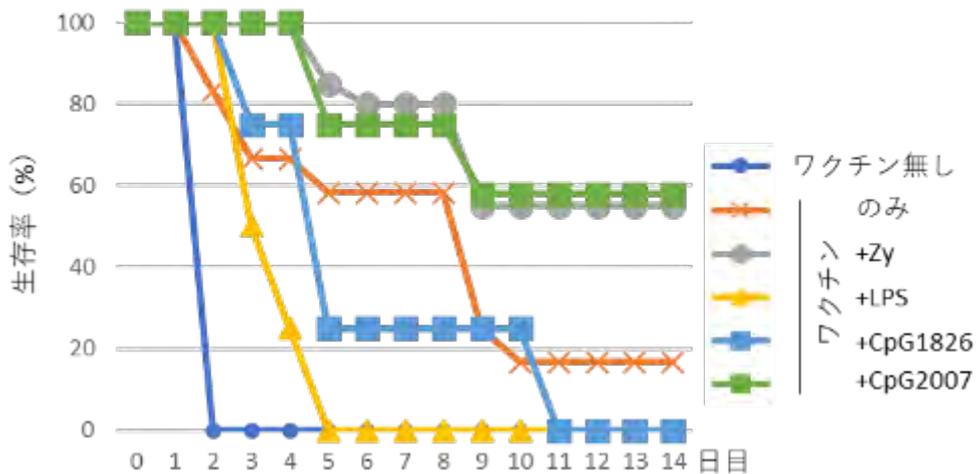


図2 アジュバント候補のHPAIV感染生存率への影響

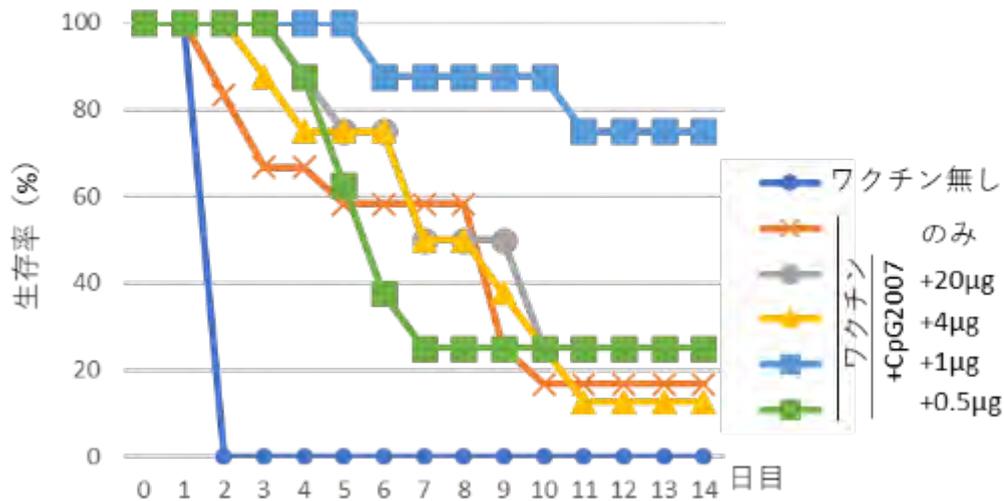


図3 CpG2007のHPAIV感染生存率への影響

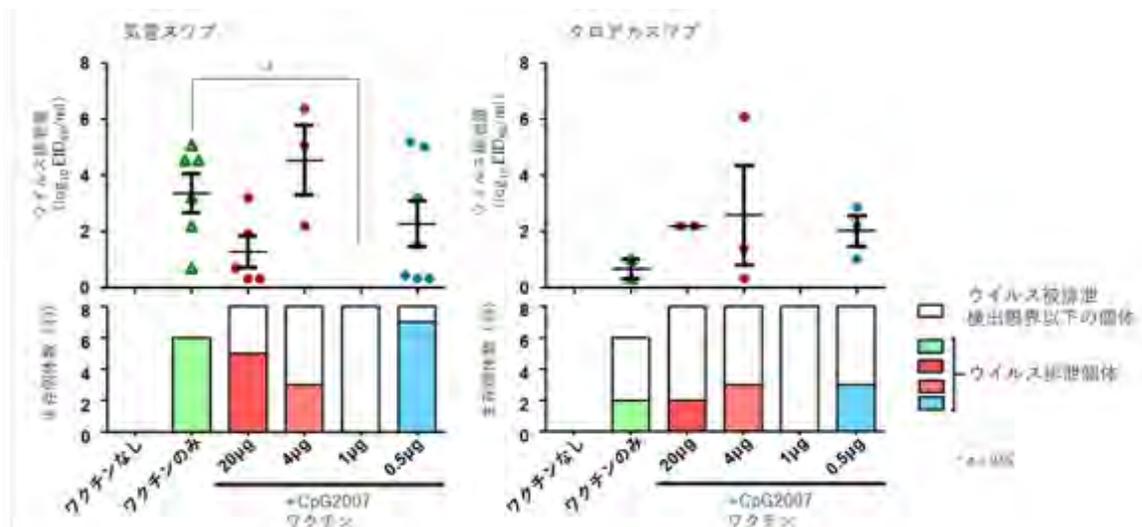


図4 アジュバントCpG2007の攻撃2日後におけるウイルス排泄への影響

・アジュバント効果の検証

アジュバントとしてZyおよびCpG2007を使用することにより、ワクチンのみを接種した群に比べて、HPAIV攻撃後の鶏の生存時間が有意に延長した(図5)。これらのアジュバントによる抗体誘導を、血中のHI抗体および粘膜へのIgAを測定することにより比較した。その結果、CpG2007をアジュバントとして用いた場合、ワクチンのみを接種した群に比べ血中のHI抗体価が有意に上昇することが確認された(図6)。一方で、Zyをアジュバントとして用いた場合、気管粘膜での高いIgAの誘導が確認された(図7)。これらの結果から、点眼ワクチンにアジュバントとしてCpG2007を使用することで血中抗体の誘導を、Zyを使用することで粘膜免疫の誘導を増強することが明らかとなった。

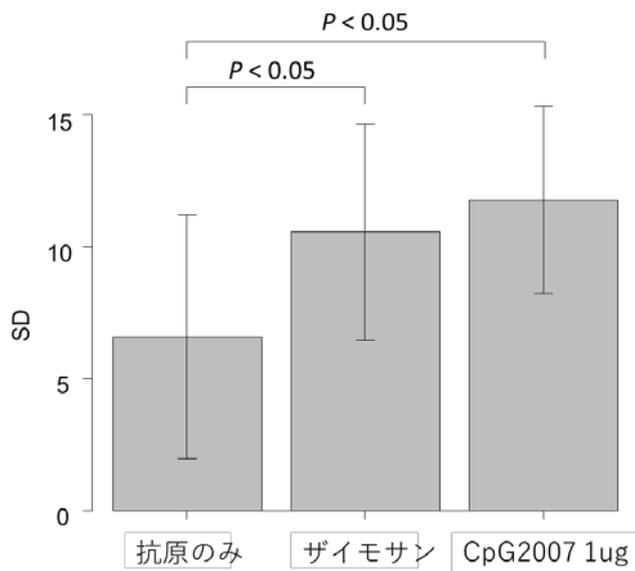


図5 アジュバント添加によるHPAIV攻撃後の平均生存時間への影響

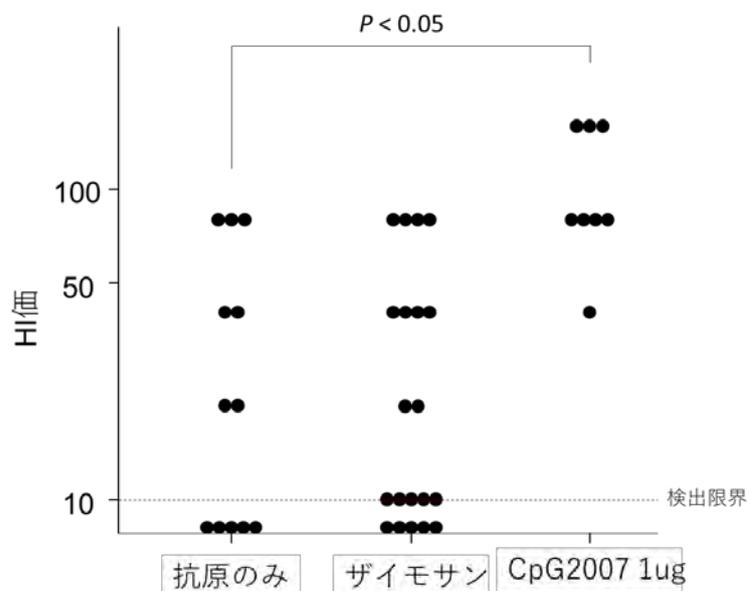


図6 アジュバント添加による血中抗体への影響

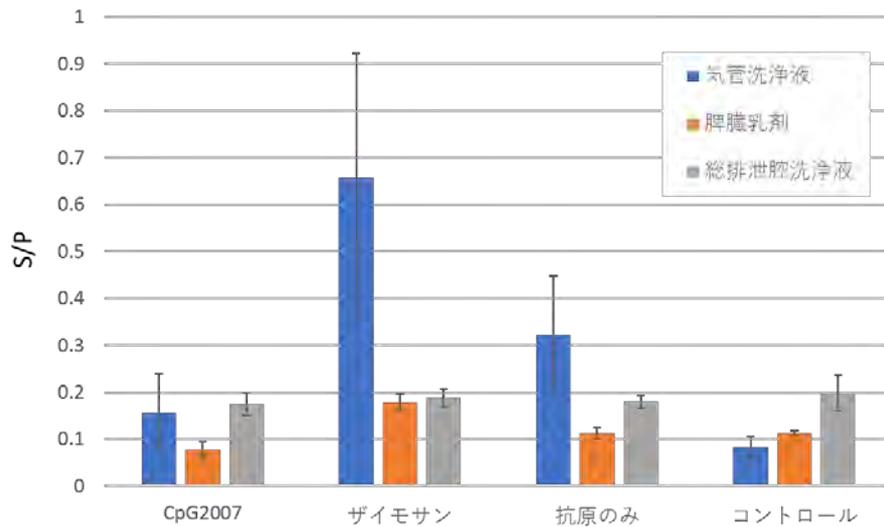


図7 アジュバント添加によるIgA誘導への影響

実施課題(1)-2 ワクチン投与方法が家禽の免疫応答に及ぼす影響の解明

・アジュバントの選定

合成アジュバント (Pam2、polyI:C) がトリのToll様受容体 (TLR) 2型および3型を活性化して免疫を亢進するかトリマクロファージ様細胞のHD11 *in vitro* 系で検討したが、単なる振り掛けでは応答は再現しなかった。

・HD11細胞の妥当性

本研究に使ったトリミエロイド細胞HD11はTLR2.2、TLR3を発現せずTLR2.1、MDA5を強発現した(図1-1)。HD11はpolyI:CにIFN応答しなかったがIL-1β、IL-18は上昇した。一方、Pam2刺激でHD11は4時間後と19時間後にIL-1β、19時間後にIFN-βの発現誘導を認めた(図1-2)。

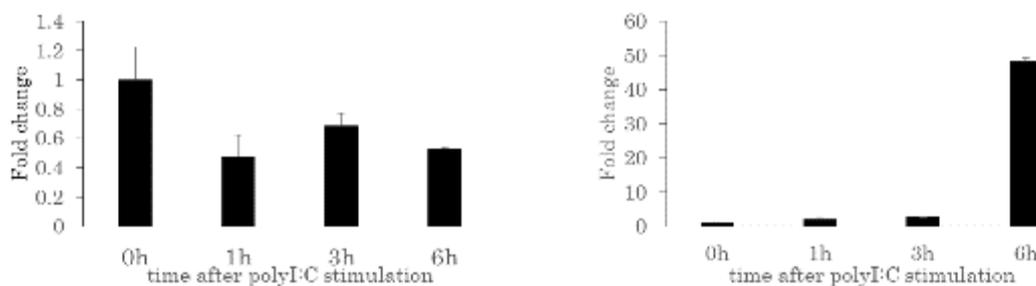


図1-1 *in vitro*におけるアジュバントへの応答性 (HD11細胞でのpolyI:C 刺激によるI型IFN及びIL-1β mRNAの誘導)

HD11細胞をpolyI:C 50 g/mlで刺激し、0、1、3、6時間後に細胞からRNAを回収し、IFN-β、IL-1β mRNAの発現を定量PCR法にて定量化した。無刺激時のターゲット遺伝子の発現量を1とし、経時的発現量の変化としてグラフに示す。

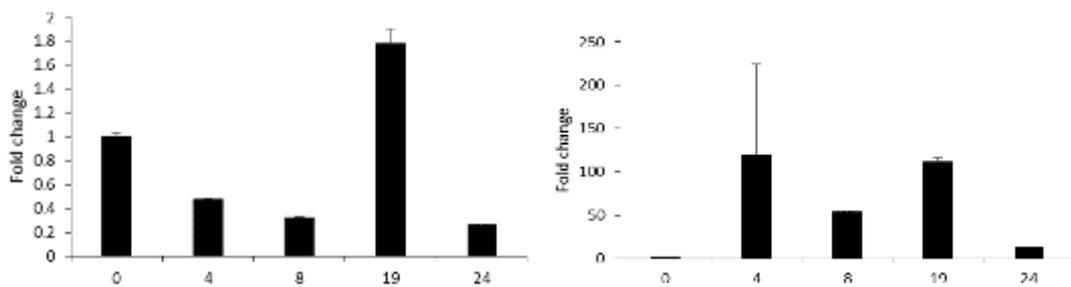


図1-2 in vitroにおけるアジュバントへの応答性 (HD11細胞でのPam2刺激によるI型IFN及びIL-1β mRNAの誘導)

HD11細胞をPam2 10 μg/mlで刺激し、0、4、8、19、24時間後に細胞からRNAを回収し、IFN-β、IL-1β mRNAの発現を定量PCR法にて定量化した。

・点眼の妥当性

ニワトリの結膜における免疫担当細胞におけるpam2、polyI:Cの点眼に対するリンパ球の全身応答を調べたところ。肺とハーダー腺でPam2刺激ではIL-1βのmRNAの増加が見られたが、type I IFNは殆ど増加しなかった。一方、polyI:Cほどのサイトカイン、IFNも増加させなかった(図2-1、2、3)。

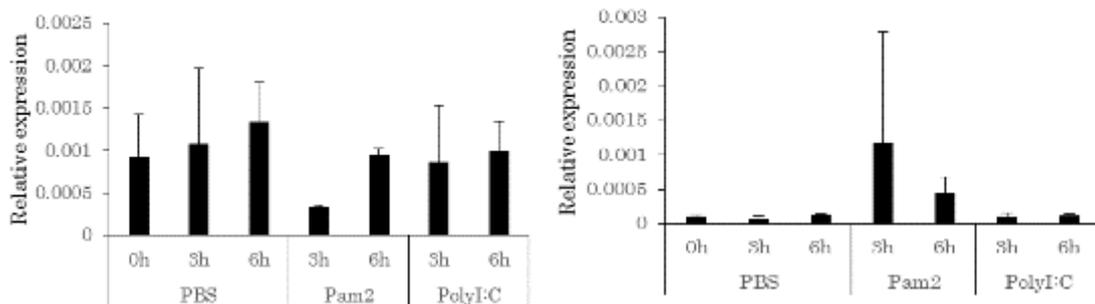


図2-1 アジュバント点眼に対するin vivoでの応答性 (ハーダー腺における遺伝子発現の変化)

ニワトリにPam2、PolyI:Cを点眼し、3、6時間後にハーダー腺脾臓を採取し、RNAを抽出後定量PCR法にてIFN-β、IL-1β mRNAの発現を定量化した。β-actinの発現量を内部標準にし、β-actinに対するターゲット遺伝子の発現量をグラフで示す。N=3、* p< 0.05。

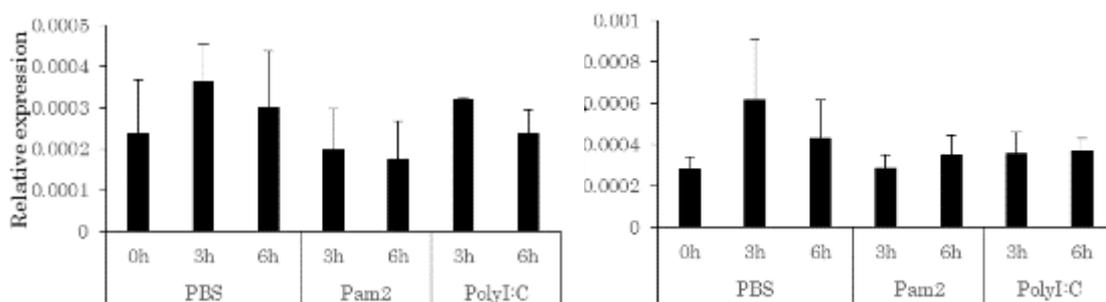


図2-2 アジュバント点眼に対するin vivoでの応答性 (脾臓における遺伝子発現の変化)

ニワトリにPam2、PolyI:Cを点眼し、3、6時間後に脾臓を採取し、RNAを抽出後定量PCR法にてIFN- β 、IL-1 β mRNAの発現を定量化した。 β -actinの発現量を内部標準にし、 β -actinに対するターゲット遺伝子の発現量をグラフで示す。N=3、* p< 0.05。

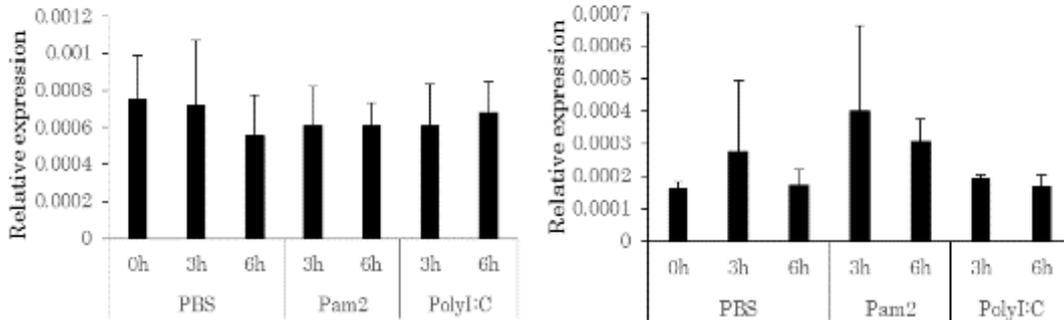


図2-3 アジュバント点眼に対するin vivoでの応答性（肺における遺伝子発現の変化）ニワトリにPam2、PolyI:Cを点眼し、3、6時間後に肺を採取し、RNAを抽出後定量PCR法にてIFN- β 、IL-1 β mRNAの発現を定量化した。 β -actinの発現量を内部標準にし、 β -actinに対するターゲット遺伝子の発現量をグラフで示す。N=3、* p< 0.05。

TLR3 mRNAはハーダー腺で僅かに検知されたが肺、脾臓では検知量以下であった。MDA5はどの臓器でも高発現した。TLR2ファミリーはどの臓器でも発現していなかった（図2-4）。Pam2はTLR2以外のセンサーに検知されているかもしれない。点眼ワクチンのアジュバントの適性はトリへの in vivo投与実験による免疫応答を解析する必要があるが、IL-1 β の誘導がTLRに依存して起きることが判明した。今後インフラマソームの免疫評価系が必要になる。

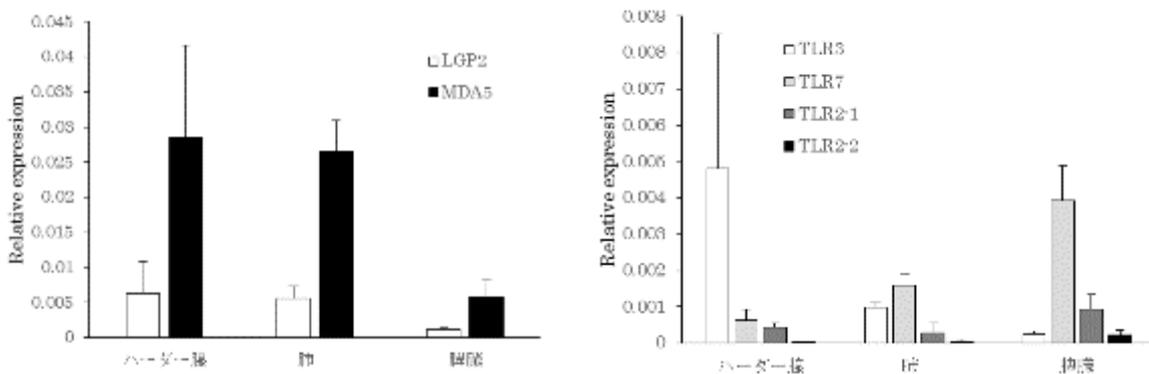


図2-4 アジュバント点眼に対するin vivoでの応答性（各臓器におけるTLR及び核酸認識受容体の発現量）

無刺激時のニワトリの各臓器よりRNAを抽出し核酸認識受容体及びTLRの発現を定量PCR法にて定量化した。 β -actinの発現量を内部標準にし、 β -actinに対するターゲット遺伝子の発現量をグラフで示す。

以上のことから、Pam2、polyI:Cの哺乳類TLR2/3アゴニストがトリ点眼ではIL-1 β とIL-18を活性化するがtype I IFNを殆ど誘導しないことが判明した。また、非ほ乳類のトリでもTLRアゴニストが細胞質内インフラマソームやRNAセンサーを活性化しようと分かった。

実施課題（１）－３ ワクチン投与方法が家禽の免疫応答に及ぼす影響の解明

・ワクチンの投与方法が免疫応答に及ぼす影響の解明

ウイルスまたは蛋白抗原、あるいはカーボン粒子を点眼投与し、眼底付近に位置する Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT、図 1) と呼ばれるリンパ組織で抗原提示細胞とカーボンが隣接して存在しており、CALTで抗原提示が行われている事が示唆された(図 2)。しかしながら、CALTでは免疫記憶を形成する胚中心の形成が見られなかった。一方、投与したカーボンが移動する脾臓の胚中心で免疫記憶が形成されることが示唆された。

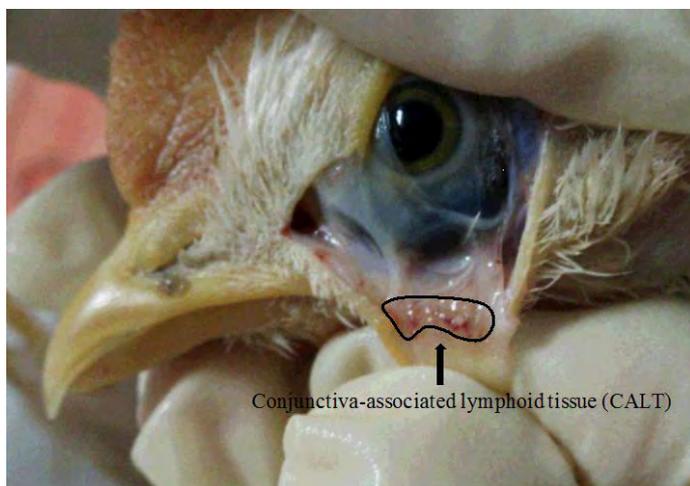


図 1 CALT の位置

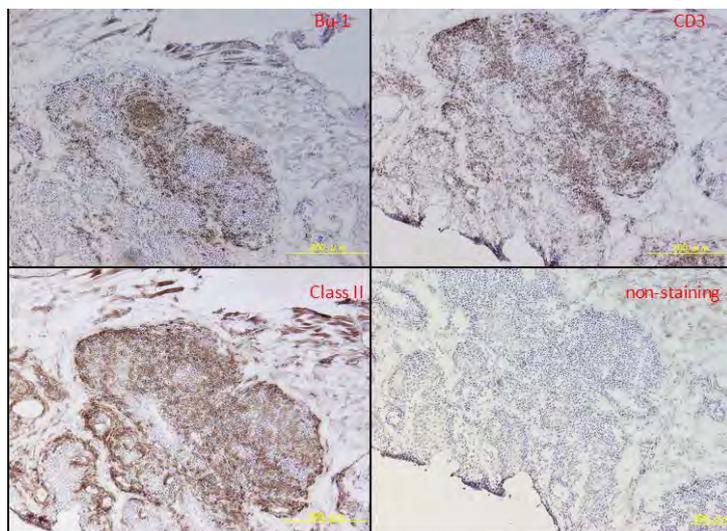


図 2 CALT での Class II 陽性細胞等の局在

点眼投与に用いるアジュバントの種類を検討した結果、粘膜免疫で効果的な抗原特異的IgA抗体の産生を刺激するアジュバントとして、ザイモサンが適当である事を明らかにした。また、点眼免疫では、同じ抗原蛋白量でも液量を少なく投与することで抗体価がさらに上昇することが明らかとなった(図 3)。

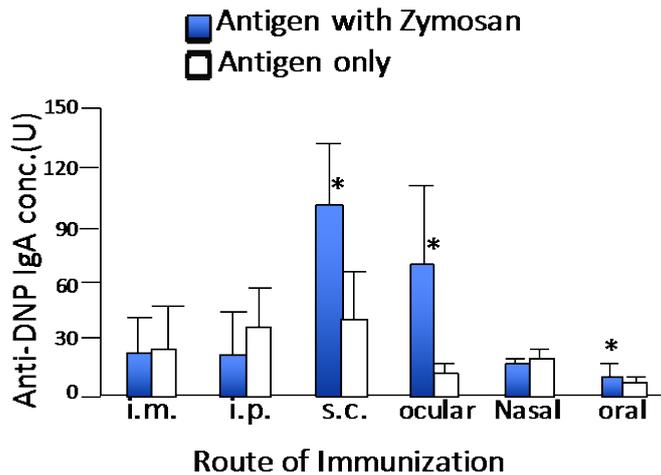


図3 抗原特異的 IgA 産生におけるザイモサンの効果

Dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin (DNP-KLH) というハプテンキャリアー系の抗原だけでなく、高病原性ニワトリインフルエンザウイルスを弱毒化した株から作製したレコンビナントタンパクを抗原として用いた場合にも、点眼免疫で血清中だけでなく、涙液中の抗原特異的なIgA抗体の産生が高まることを明らかにした（図5）。

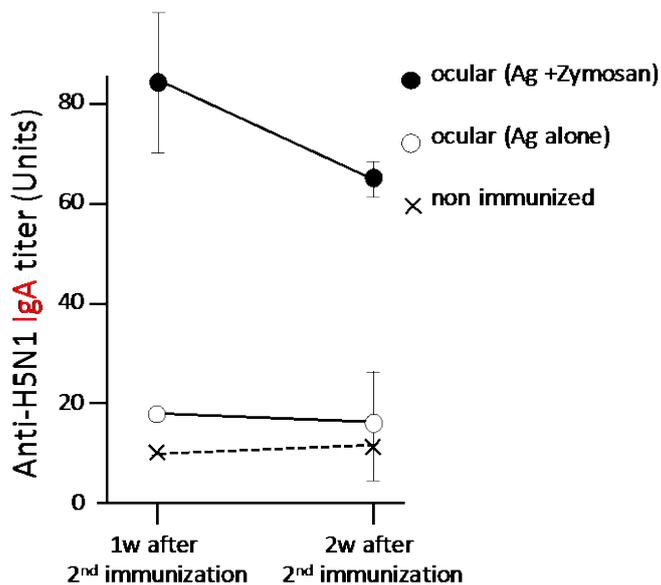


図5 不活化ワクチンに対する涙液中の抗原特異的 IgA 抗体応答

粘膜免疫で重要なIgA抗体へのクラススイッチ機構を解析したところ、ニワトリIgA抗体のクラススイッチでは、ゲノム上で逆位に存在するS α とC α （IgAの定常領域遺伝子）が、S μ とS α との間で遺伝子変換することで起こり、その結果、C μ （IgMの定常領域遺伝子）は環状DNAとなってゲノム上から切り取られないことを明らかにした（図6）。

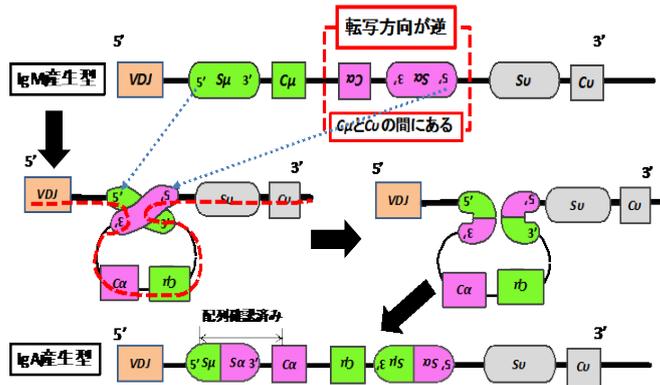


図6 ニワトリのIgA産生細胞へのクラススイッチ機構

IgAへのクラススイッチの際、IgM遺伝子配列の排除が起らずに反転してゲノムに残ることが明らかになった。

ザイモサンの構成成分であるβグルカンとマンナンを用いてそれぞれのアジュバント効果を検討したところ、βグルカンとマンナンは同じようにアジュバント効果があり、特にIgA抗体産生に対する効果が高いことがわかった(図7、8)。

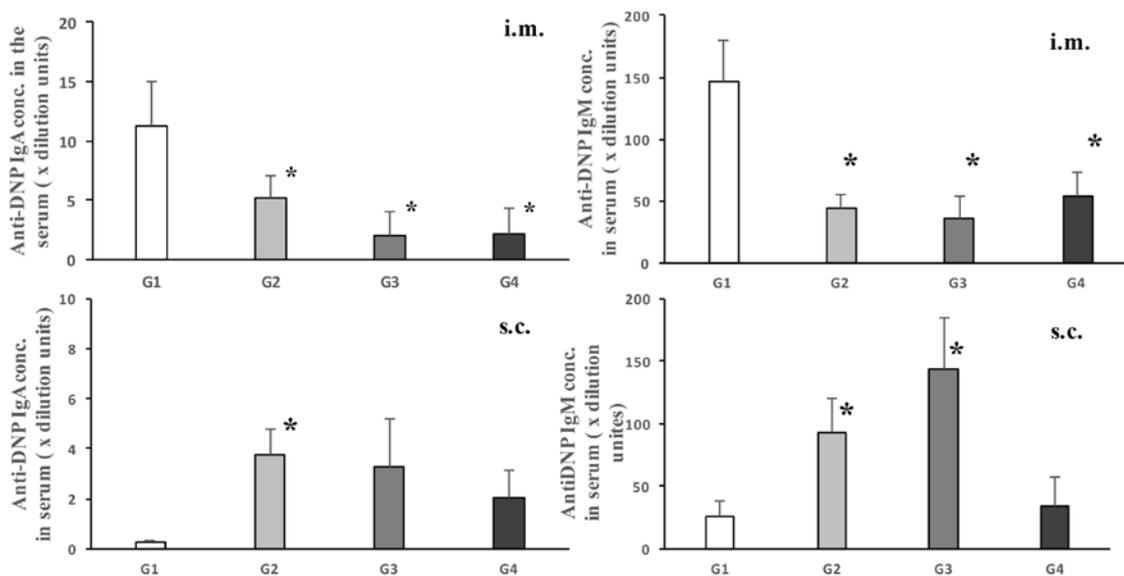


図7 βグルカンのアジュバント効果

G1 : 抗原+PBS、G2 : 抗原+βグルカン0.1mg/kg BW、G3 : 抗原+βグルカン0.2mg/kg BW、G4 : 抗原+βグルカン0.4mg/kg BW

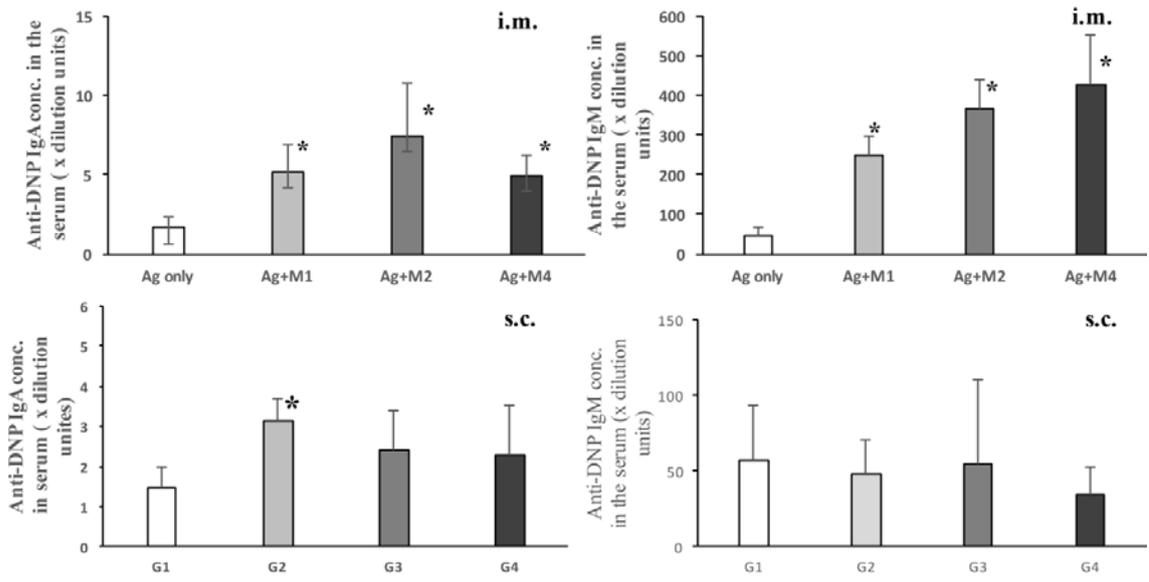


図8 マンナンのアジュバント効果

G1 : 抗原+PBS、G2 : 抗原+マンナン0.1mg/kg BW、G3 : 抗原+マンナン0.2mg/kg BW、G4 : 抗原+マンナン0.4mg/kg BW

・移行抗体がワクチンに対する抗体応答を抑える機構の解明

移行抗体存在下で雛に免疫を行った場合、1個体あたり、5 mg～8 mgの抗原特異的移行抗体が雛に移行することで、免疫抑制が起こることを明らかにした (図9)。

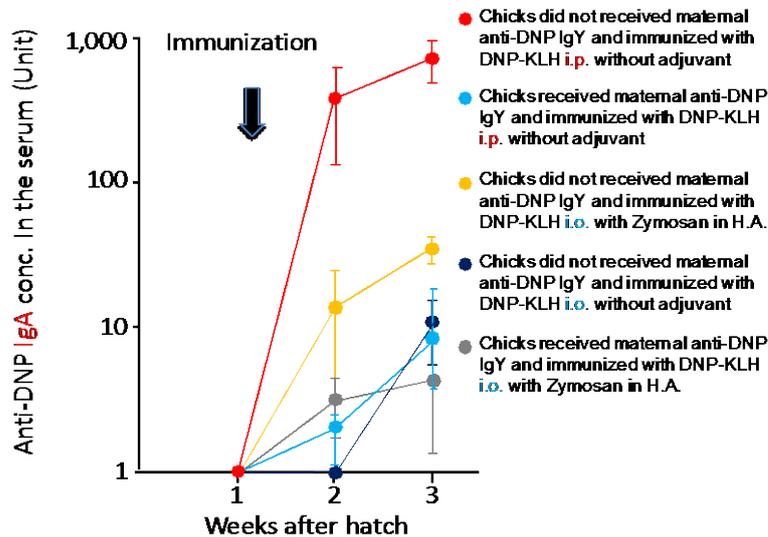


図9 移行抗体存在下での免疫抑制効果

移行抗体存在下で雛に免疫を行った場合、免疫抑制は8週後以降まで継続し、また、母鶏由来抗原特異的抗体が認識する抗原ワクチンを投与すると、その抗原に対する免疫抑制ばかりで無く、他の抗原に対する抑制も一過性に起こってしまうことも明らかにした (図10)。

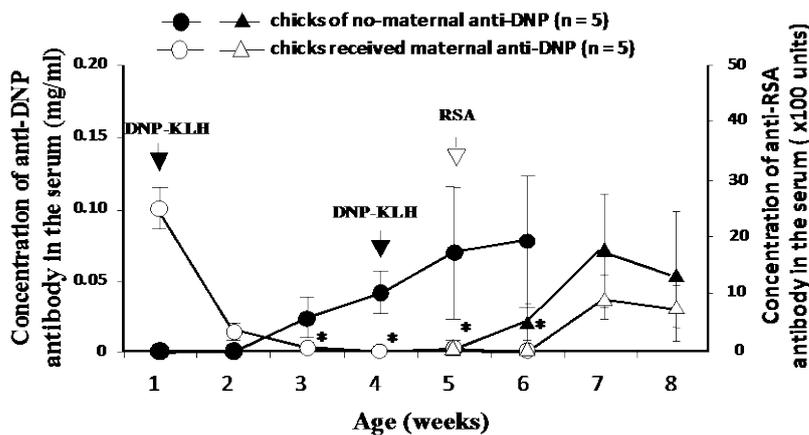


図 10 移行抗体存在下における免疫抑制の持続期間

ワクチン投与ルートとしてファブリシウス嚢を用いた場合、点眼免疫の場合と同様に免疫抑制が起こり、抗体のFc領域が抑制に大きく関与して居ることが明らかとなった。

Chick is treated with	anti-DNP immune response
Anti-DNP IgY +DNP-KLH	Suppression
Anti-DNP Fab +DNP-KLH	Normal immune response

図 11 移行抗体による抗体産生抑制現象におけるFc部の影響

実施課題（1）－4 鶏特有の粘膜免疫組織の機能の解明

点眼または噴霧により投与できる高病原性鳥インフルエンザワクチンの投与方法の選択及び有効性を評価するため、ニワトリの眼鼻部位における解剖学的構造と局所免疫機構についての基礎的情報を明らかにした。

・ニワトリ鼻部の解剖学的特徴

ニワトリでは眼鼻部位における局所免疫機構を司るハーダー腺を眼窩に、鼻粘膜には鼻粘膜関連リンパ組織 (NALT) を有する。ニワトリの副鼻腔である眼窩下洞 (図1 青色部分) は、著しく広い腔所として鼻腔 (図1 橙色部分) の後位 (頭側) に位置していた。その前端は、鼻腔の後位約1/3で閉じていたが、眼窩前端からこれに至るまでの間に鼻腔との明確な交通は認められなかった。鼻涙管 (図1 黄色部分) は、鼻腔と眼窩下洞の間を走行し、鼻腔の後位約1/6で鼻腔と交通し合っていた。副鼻腔は、今回調べた眼窩前端よりもさらに後位に広がっていた。上述の所見より、眼窩と鼻腔は鼻涙管により交通することが明らかとなった。これは、ハーダー腺の分泌液が鼻涙管を通じて鼻腔に至ることを示すと共に、ワクチンの点眼によりハーダー腺だけではなく鼻粘膜の形質細胞も刺激しうることを示唆する。

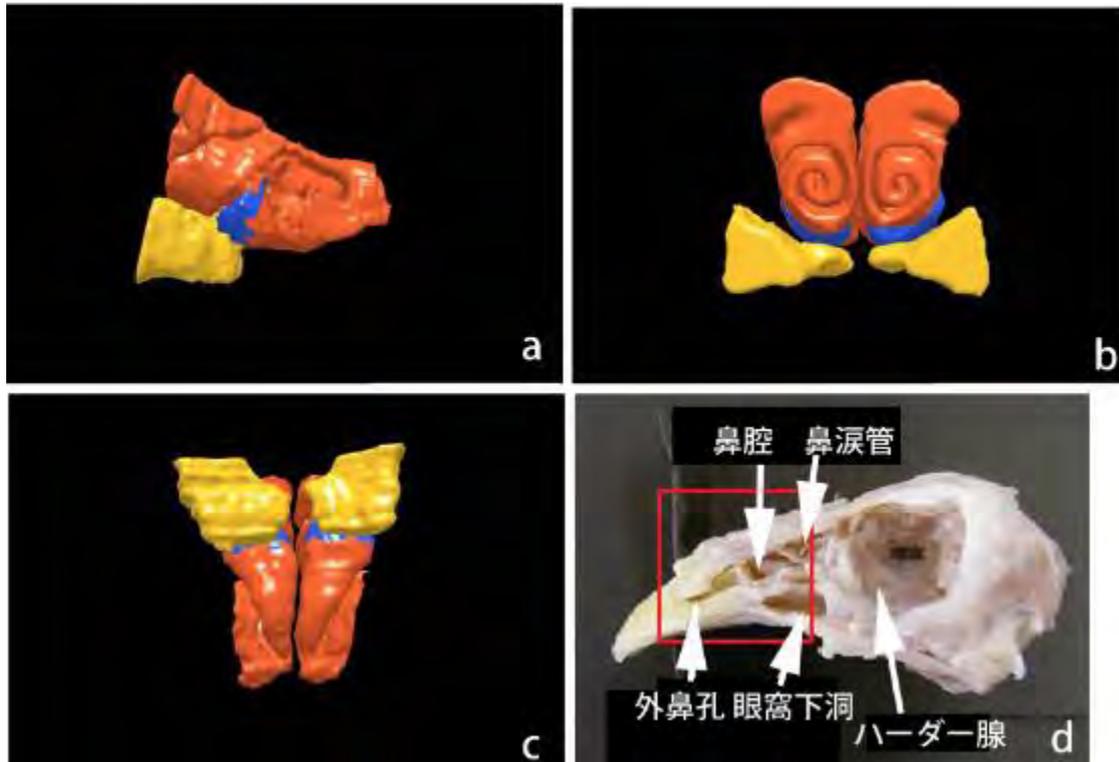


図1 ニワトリ鼻部腔所の3次元再構築像

□で囲まれた領域の連続切片より三次元再構築像を作製した。鼻腔(橙色)、鼻涙管(青色)および眼窩下洞(副鼻腔、黄色)。a: 右上方からの像。図の右側が吻側、左側が頭側。b: 眼窩側からの像、c: 底側からの像、d: ニワトリ頭部の写真

・卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) による刺激後のハーダー腺を含むNALTにおける形質細胞の動態解析

いずれの免疫グロブリンも点眼後15分では有意な上昇は認められなかった。点眼後30分において対照である右側に比して有意なmRNAの発現が認められた。特にIgAの遺伝子発現は、対照の約75倍の高値を示した。点眼後30分におけるIgG及びIgMの遺伝子発現は、それぞれ対照の約30倍及び約15倍の値を示した。しかし、1時間以降ではいずれの免疫グロブリンにおいても有意な上昇は認められなかった(図2)。3種類の形質細胞は、間質に観察された。しかし、いずれの時間においても形質細胞種間に明らかな染色性の違いは見出されなかった(図3)。擬似抗原の点眼により、点眼後30分と云う比較的早期にハーダー腺の形質細胞は、応答を示すことが確認された。この応答は60分後には消失してしまうことも明らかとなった。

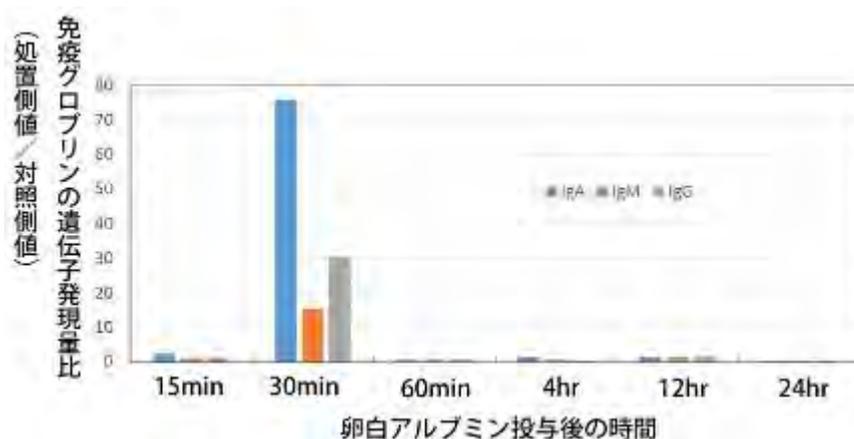


図2 卵白アルブミン投与後の免疫グロブリンの遺伝子発現
対照側(右側)に対する投与側(左側)における発現比率で表している。

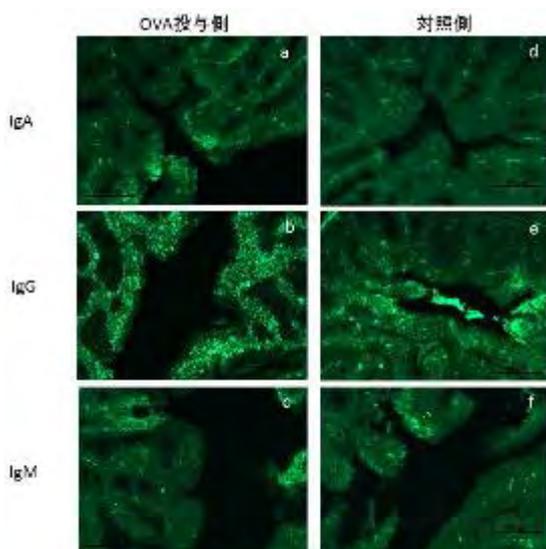


図3 卵白アルブミン点眼後30分におけるIgA(a、d)、IgM(b、e)及びIgG(c、f)陽性細胞の免疫組織化学染色像

a、b、c: 卵白アルブミン点眼側(左側)のハーダー腺。間質に陽性細胞が観察されるが、対照側と比べ染色性に明白な相違は認められない。d、e、f: 対照側(右側)のハーダー腺。

・NALTにおける免疫担当細胞の分布

3種類の免疫グロブリン(IgA、IgGおよびIgM)は、すべてこれまでの報告通り間質に認められた。しかし、同じ免疫グロブリン種でも形質細胞により蛍光強度に差が認められた(図4)。また、鼻腔の呼吸上皮、鼻涙管および眼窩下洞の上皮に3種類の形質細胞が確認されたが、IgG陽性細胞が最も多く観察された(図5)。ハーダー腺の間質だけではなく、鼻粘膜下にも形質細胞が比較的多く存在することが確認された。以上から、ワクチンの点眼投与はハーダー腺と鼻腔粘膜下の形質細胞の刺激に有効であることが示された。

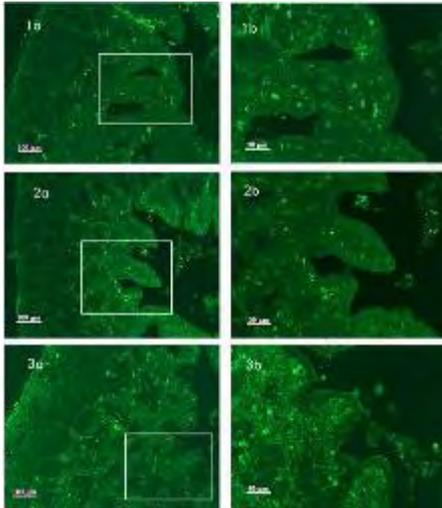


図4 60日齢ニワトリのハーダー腺におけるIgA(a、d)、IgM(b、e)及びIgG(c、f)陽性細胞の免疫組織化学染色像

a、b、c：低倍率像、d、e、f：それぞれa、b、cの口内の高倍率像。

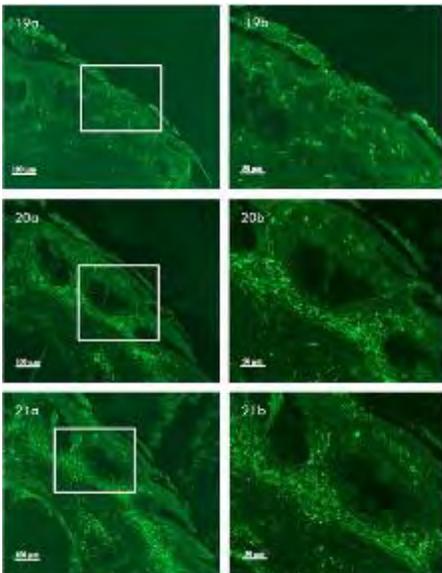


図5 60日齢ニワトリの鼻涙管におけるIgA(a、d)、IgM(b、e)及びIgG(c、f)陽性細胞の免疫組織化学染色像

a、b、c：粘膜上皮内に陽性細胞が観察できる。d、e、f：それぞれa、b、cの口内の高倍率像。

実施課題（1）－5 抗インフルエンザ剤シード物質の探索

・NP阻害化合物のスクリーニング

①ウイルスの複製に必要なNP領域の同定

インフルエンザウイルスはウイルスタンパク質上に7つの異なる核外移行シグナル（NES）が存在しており、NESを標的とした薬剤スクリーニング系を構築するために、まずこれらのNESのウイルス複製への寄与を検討した。リバーズジェネティクス法によりそれぞれのNESに変異を導入したウイルスを作成し、複製能への影響を検討したところ、ヌクレオプロテイン（NP）のNES3への変異導入によって複製が阻害されることが示された（図1上）。また、NPの局在を蛍光染色により確認したところ、NES3に変異を導入したものはNES1やNES2に変異を導入し

たものとは異なり、核外移行が強く阻害されていたことから、NP-NES3がインフルエンザウイルスの核外移行に最も重要であることを明らかにした（図1下）。NP-NES3はウイルス株間で高度に保存されており、ウイルス複製に必須の領域であることから創薬の標的として有望であると考え、NP-NES3をターゲットとしたスクリーニング系の構築を行うこととした。

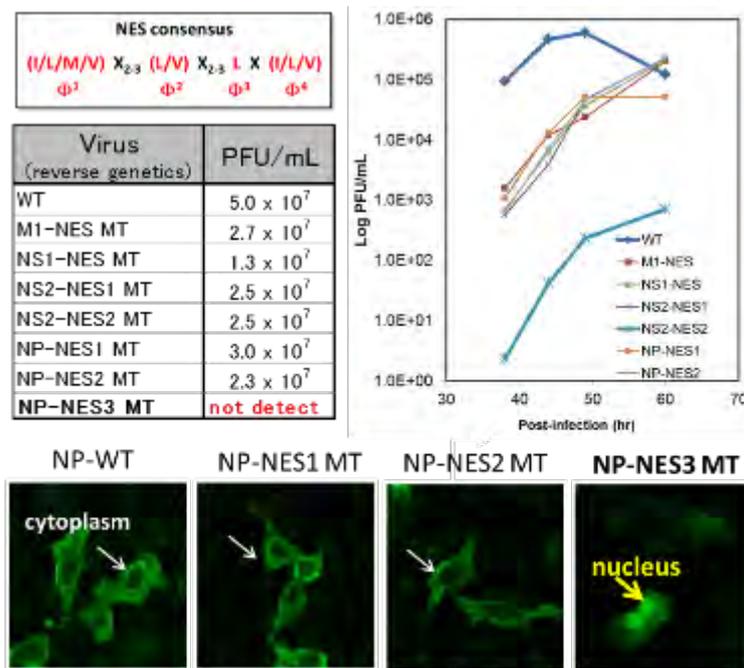


図1 NP-NES3がインフルエンザ複製に最も重要

②スクリーニング系の確立

緑色蛍光タンパク質であるAcGFPとNP-NES3を連結した融合タンパク質を、恒常的に発現するMDCK細胞株を樹立し、細胞イメージング解析により核外移行阻害率を測定可能なハイスループットスクリーニング系を構築した（図2）。

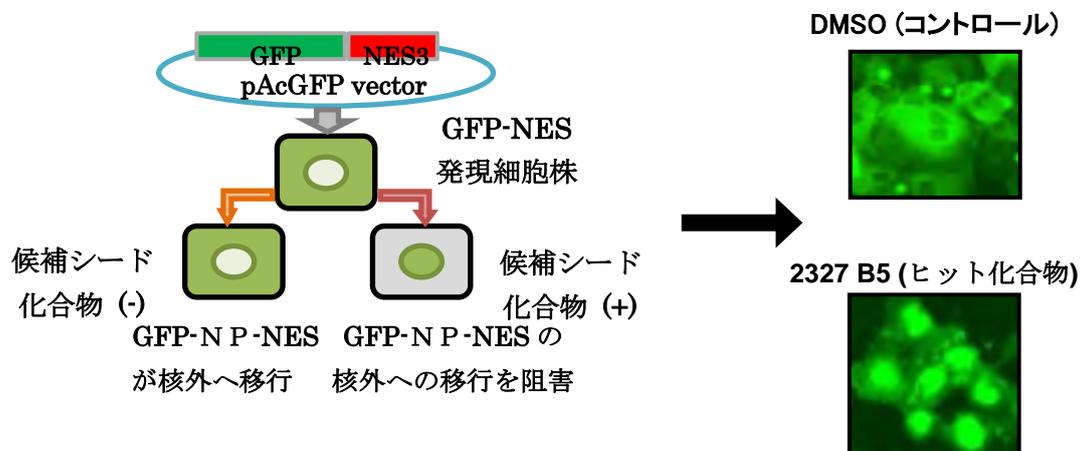


図2 核移行阻害物質スクリーニング系

③NP阻害薬のスクリーニング

構築したスクリーニング系を用いて、東京大学創薬機構コア化合物ライブラリー9600化合物のスクリーニングを行い、強い核外移行阻害活性を示すヒット化合物を40化合物獲得した。

さらに2次評価として、これらヒット化合物の細胞毒性をWST-1アッセイにより評価し、11化合物がMDCK細胞に対し低毒性であることを確認した。3次評価としてインフルエンザA/WSN/1933株感染に対する抗ウイルス活性をプラーク法により評価し、最終的に $IC_{50}=15.9\mu M$ で抗ウイルス活性を示す化合物DP2392-E10を同定した（図2）。

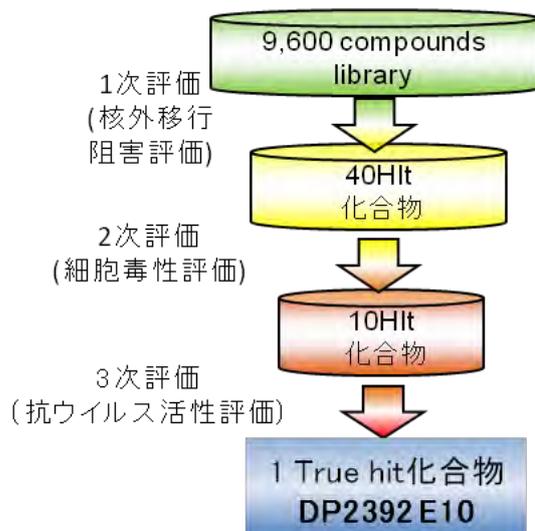


図2 抗ウイルス活性を示す化合物の同定過程

・抗ウイルス活性の評価

①抗ウイルス活性の評価

ヒット化合物DP2392-E10による抗インフルエンザ活性がWSN株以外の他の亜型に対しても有効であるかを評価するため、9つの株を用いてWSN株同様に抗ウイルス活性評価を行い、 IC_{50} を算出した。その結果、DP2392-E10はすべての株に対し、 $IC_{50}=12.6-33.12\mu M$ で抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった（表1）。このことからDP2392-E10は多くの株にも有効な薬剤候補であることが示唆された。

表1 異なるインフルエンザ株におけるDP2392-E10の抗ウイルス作用

Virus strains	Subtypes	IC_{50} (μM)	SI
A/WSN/1933	H1N1	15.89 ± 2.52	3.85
A/California/7/2009	H1N1	34.57 ± 8.57	1.77
A/Hong Kong/4801/2014	H3N2	32.06 ± 9.84	1.91
A/Switzerland/9715293/2013	H3N2	30.48 ± 5.37	2.01
A/Texas/50/2012	H3N2	26.15 ± 7.09	2.34
A/Massachusetts/3740/1965	H6N2	20.82 ± 4.46	2.94
A/Ontario/6118/1968	H8N4	12.63 ± 3.64	4.85
A/Turkey/Wisconsin/1966	H9N2	26.20 ± 2.87	2.34
A/Mallard/Astrakhan/263/1982	H14N5	33.12 ± 15.97	1.85
A/duck/Australia/341/1983	H15N8	19.20 ± 1.19	3.19
Cell lines		CC_{50} (μM)	
MDCK		61.25 ± 2.67	
A549		94.49 ± 7.56	

② ヒット化合物の特異性の解析

DP2392-E10はインフルエンザNP-NES3による核外移行阻害能を持つことでスクリーニングされたが、この作用がNP-NES3特異的であるかを確認するため、他の核外移行シグナルに対する阻害能を検証した。その結果、DP2392-E10はNP-NES3以外の核外移行シグナルに対しても阻害作用を示すことが明らかになった（表2）。実際にHIV-1 NL4.3株の感染阻害実験を行ったところ、DP2392-E10はHIVの複製を阻害することが示された。

表2 DP2392-E10の各NESに対する核外移行阻害能

NES配列	EC50 (μM)
インフルエンザNP-NES3	7.49
インフルエンザNS2-NES2	14.31
エイズウイルスREV-NES	9.77

③ ヒット化合物の標的タンパク質の同定

DP2392-E10が作用する宿主タンパク質としては、核外移行受容体として様々なNESと結合し、ウイルスの核外移行に寄与することが知られるCRM1が有力であることから、光親和型リンカーを導入したNHS SepharoseビーズにDP2392-E10を固定化した化合物ビーズによるプルダウンアッセイを構築した。大腸菌で作成し、精製したFLAG-NPおよびFLAG-CRM1を、DP2392-E10を固定化したビーズに結合させた結果、DP2392-E10はNPには結合せずCRM1に強く結合することが明らかとなった（図3）。

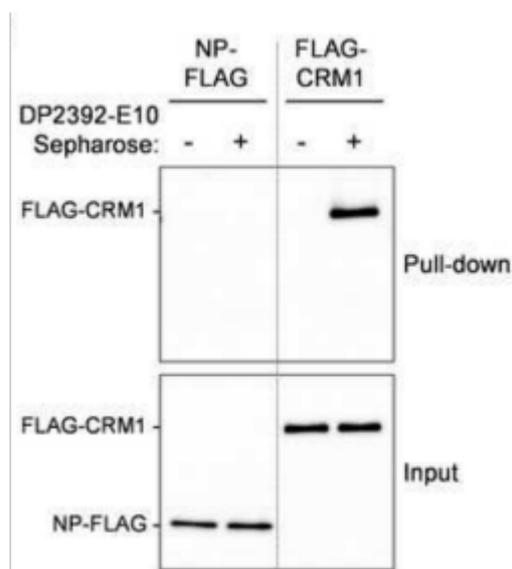


図3 DP2392-E10結合Sepharoseビーズを用いたプルダウンアッセイ

④ コンピュータシミュレーションによる結合部位解析

CRM1の立体構造情報に基づいたコンピュータードッキングシミュレーションを行い、DP2392-E10が結合するCRM1上結合ポケットの探索を行った。その結果、DP2392-E10はCRM1のHEAT9およびHEAT10近傍に作用することで、NPのCRM1への結合を阻害し、ウイルスの複製を阻害することが示唆された（図4）。

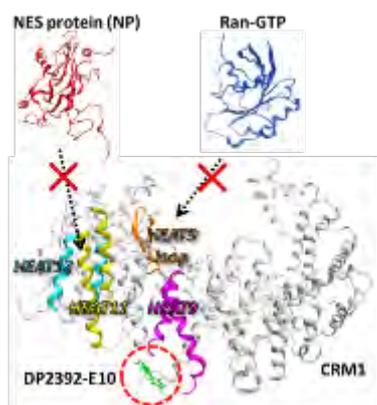


図4 コンピュータシミュレーションにより推定されたDP2392-E10結合モデル

・構造最適化研究

東大創薬機構のデータベースから同機構保有ライブラリー中のDP2392-E10構造類似体4化合物を用い、同様の抗ウイルス活性試験を行った。その結果DP2392-E10のニトロ基をフッ素に置換した構造を持つ構造類似体#5が同様に抗ウイルス活性を示すことが確認された（図5）。

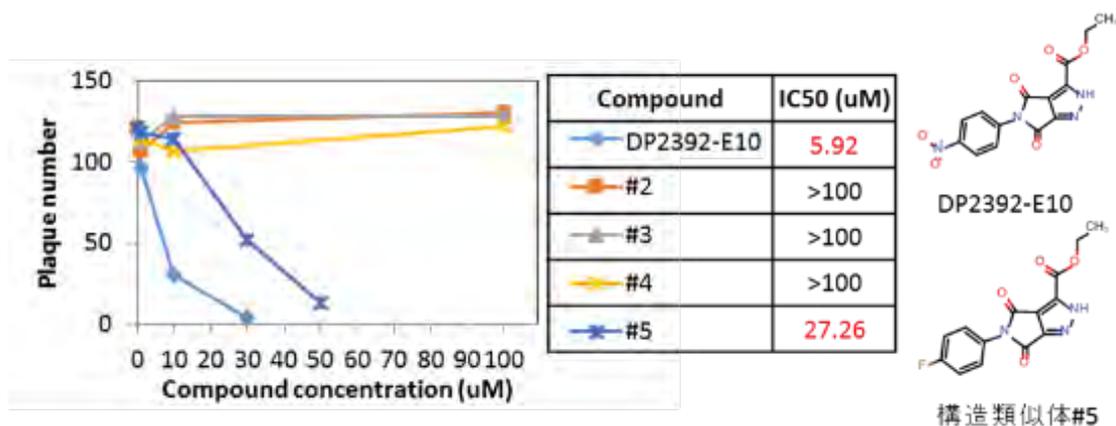


図5 構造類似体によるウイルス複製阻害試験

(2) 有効なインフルエンザワクチン技術に資する新規技術開発

実施課題(2) 鳥パラミクソウイルスベクターを用いた鳥インフルエンザワクチンの開発

・APMVベクターを用いたAIワクチンの開発

①APMVの選別

NDに対するワクチンにより免疫されている鶏においても感染し、防御免疫を誘導することが可能なウイルスを選別するため、抗NDV抗体に対する交差性によりウイルスの選別を試みた。APMV-2からAPMV-10の抗NDV抗体に対する交差性を赤血球凝集阻止(HI)試験、ウイルス中和試験により比較した結果、交差反応の低いウイルスとしてAPMV-2、APMV-6およびAPMV-10を選別した(図1)。あらかじめNDワクチンで免疫した鶏にこれらのウイルスを106 EID50点眼接種した場合、感染しそれぞれのウイルスに対する免疫を誘導することを確認した。

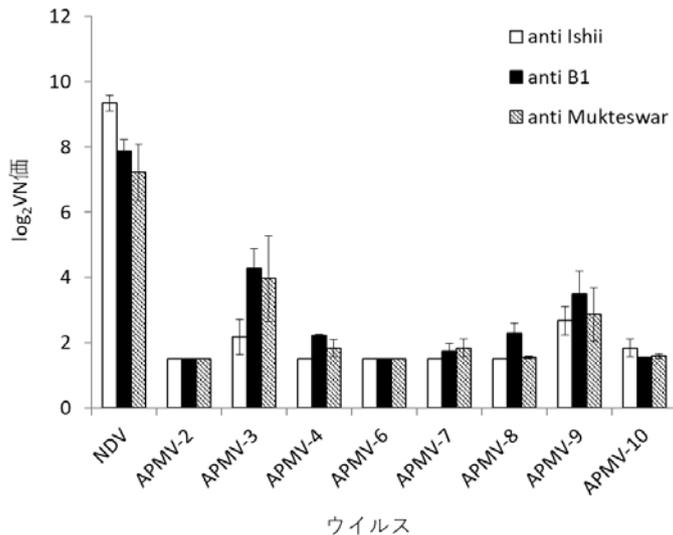


図1 中和試験による抗ND血清に対するAPMVの交差性

②遺伝子組換えAPMVの作製

抗NDV抗体への交差反応性により選別したAPMV-2、6および10の全長ゲノムをクローニングし、リバーシジェネティクス法により組換えウイルスの作出に成功した。これらのクローニングプラスミドにHPAIVのHA遺伝子を組み込むことにより、遺伝子組換えAPMV-2/HA、6/HAおよび10/HAを得た(図2)。あらかじめNDワクチンで免疫された鶏に10⁶ EID₅₀ のAPMV-2、6/HAおよび10/HAを点眼免疫した場合、HPAIV接種後の鶏の生存率は、現行のNDV/HAで免疫した鶏が0%であるのに対し、APMV-2/HAで50%、APMV-6/HAで50%、APMV-10/HAで25%であった。

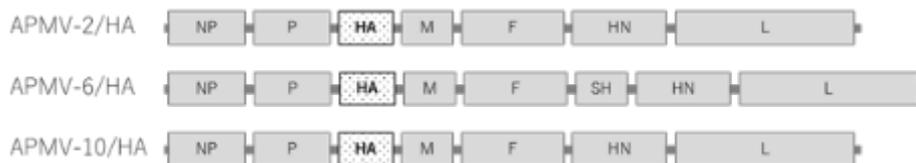


図2 組換えAPMVベクターの遺伝子模式図

③遺伝子組換えAPMVのワクチン効果の増強

作出した組換えウイルスは、あらかじめNDワクチンで免疫された鶏においてもある程度の免疫効果が確認されたが、HPAIV感染を完全に防御するものではなかったことから、これらのウイルスのワクチン効果の増強を試みた。

APMV-2、-6および-10に組み込むHPAIVのHA遺伝子のニワトリコドン比率への最適化、APMV-10について挿入するHA遺伝子の部位の検討を行った結果、HPAIV接種後の鶏の生存率は25-86%であり、完全にHPAIV感染から鶏を防御することはできなかった。

さらに、抗原遺伝子に付加する非翻訳領域に注目し、APMV-10のM遺伝子の非翻訳領域(NCR)でHA遺伝子を挟みこんだ組換え体(APMV-10/FHN-Mnt-optiHA)を作出し、ワクチン効果を検討した。その結果、NCRの付加によりHAタンパク質の発現量が増加し(図3)、あらかじめNDワクチンで免疫した鶏にAPMV-10/FHN-Mnt-optiHAで免疫した場合、HPAIV接種後の鶏の生存率は100%であった(図4)。

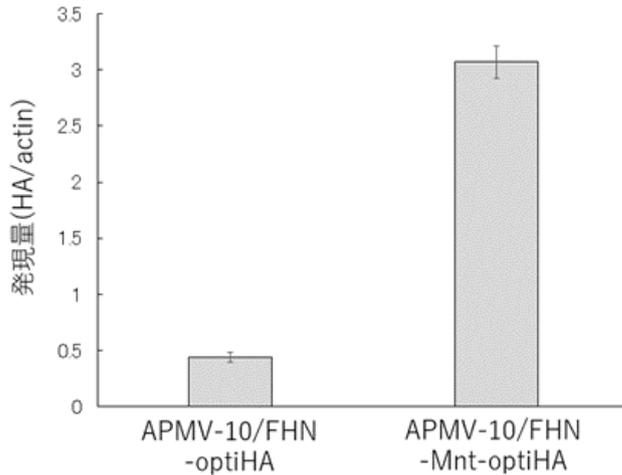


図3 組換えウイルス感染細胞におけるHA発現量

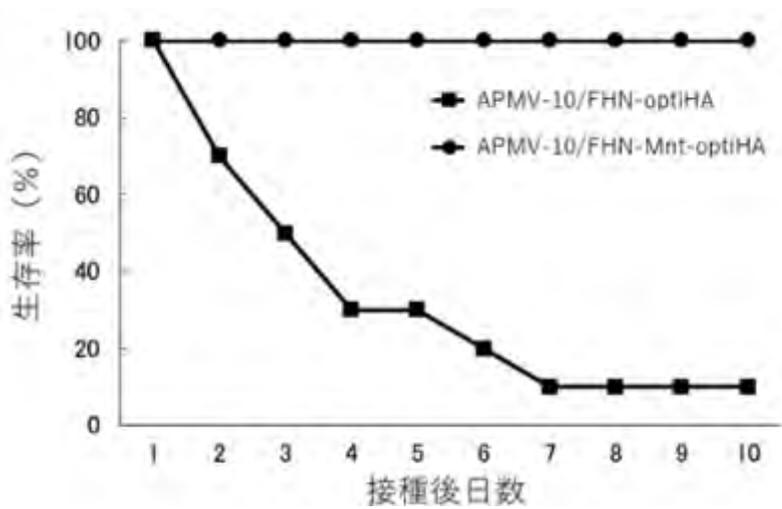


図4 HPAIV攻撃後の生存曲線

④遺伝子組換えAPMV-10/HAのNCRのワクチン効果への影響の検討

最も効果的な組換えワクチンを選別するため、ワクチン効果の増強に効果のあったAPMV-10のNCRについてさらなる検討を行った。

APMV-10の各遺伝子のNCRでHA遺伝子を挟んだ組換えAPMV-10を作製し(図5)、感染細胞における抗原の発現量を比較した。その結果、NCRを含む遺伝子改変組換えウイルスは、NCRを含まないものに比べ約200から500倍の抗原発現量があり、特にNP遺伝子のNCRを付加したウイルスで高い発現が確認された(図6)。NCRを含む遺伝子改変組換えウイルスの発育鶏卵での増殖は、接種24時間後においてNPおよびMのNCRを付加したウイルスで低かったが、48時間後においては同程度のウイルス力価が確認された。(図7)。また、あらかじめNDワクチンで免疫された鶏において、HPAIV接種に対して100%の生存を可能とする高いワクチン効果が確認された(表1)。

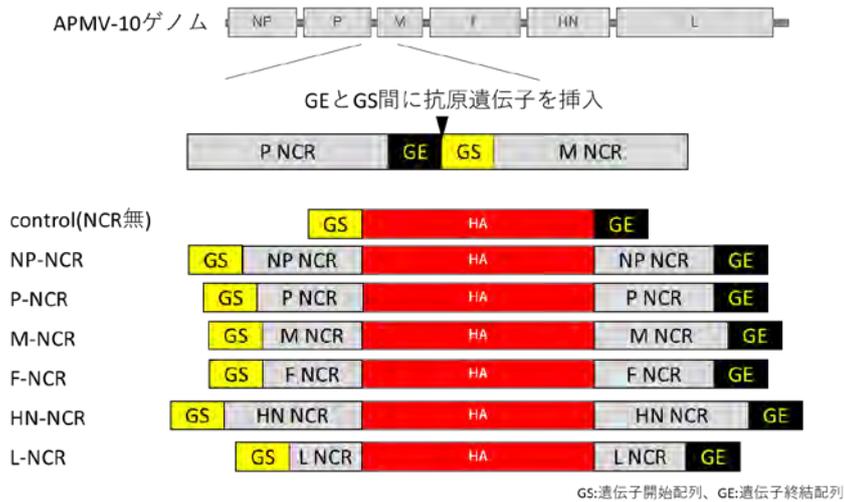


図5 NCRを抗原遺伝子の両端に組み込んだ遺伝子改変組換えワクチンの作成

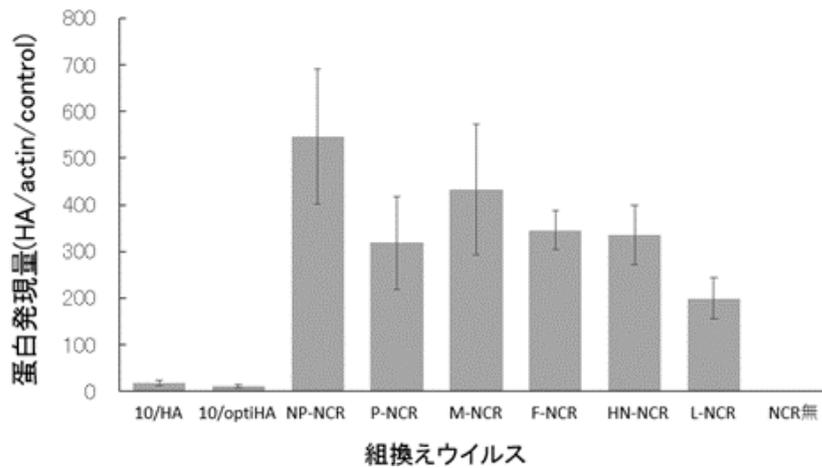


図6 遺伝子組換えワクチンの抗原発現量の比較

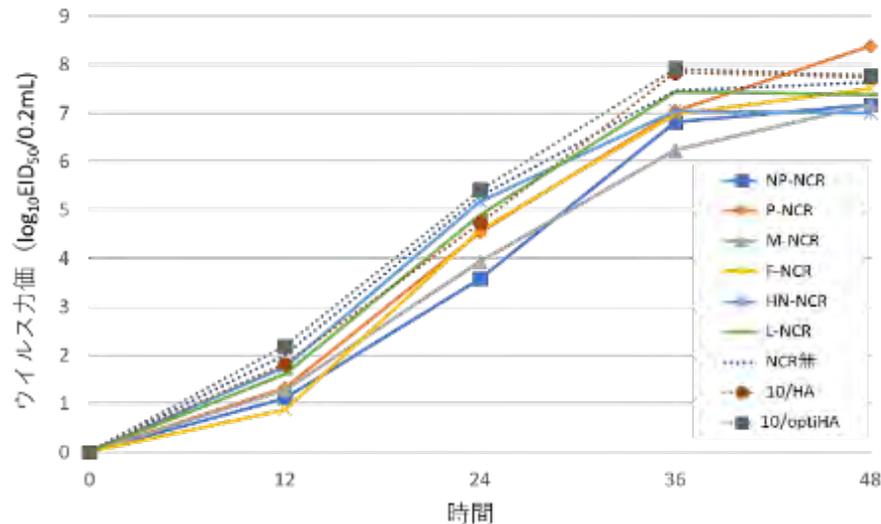


図7 遺伝子改変組換えワクチンの発育鶏卵での増殖曲線

表 1 遺伝子改変組換えワクチンのワクチン効果の比較

組換えワクチン	ウイルス攻撃後の生存率	ウイルス排泄	攻撃時の抗体価(HI)
NP-NCR	100%	0/10	5/10
P-NCR	100%	1/10	6/10
M-NCR	100%	1/10	6/10
F-NCR	100%	0/10	4/10
HN-NCR	100%	0/10	8/10
L-NCR	100%	2/10	3/10
NCR無	70%	8/10	0/10
rNDV/HA	0%	10/10	0/10
rAPMV-10/HA	25%	8/8	1/8
rAPMV-10/optiHA	50%	4/4	0/4

点眼接種で特にワクチン効果の高かったHN-NCRについて、投与方法の検討を行った結果、飲水投与においてもワクチン効果が確認された（図 8、9）。

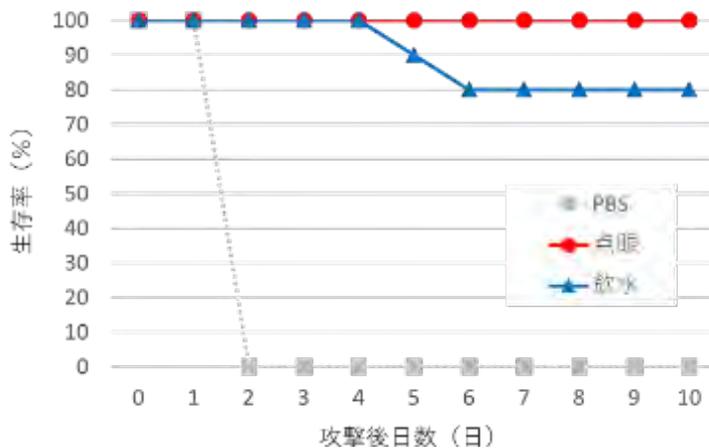


図 8 免疫14日後に攻撃した場合の鶏の生存曲線

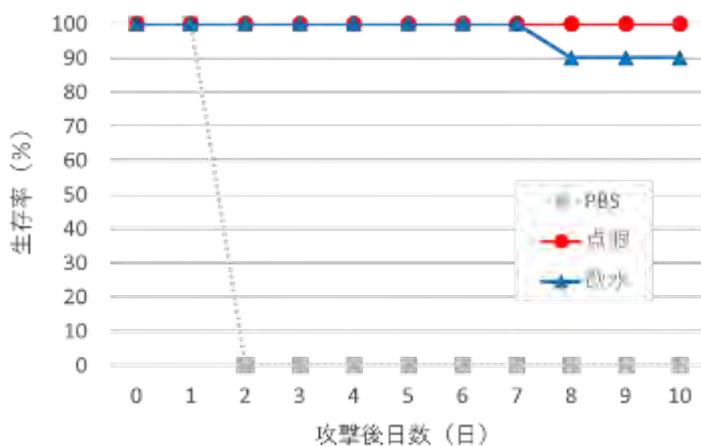


図 9 免疫21日後に攻撃した場合の鶏の生存曲線

・改変NDVベクターを用いたAIワクチンの開発

①エスケープ型NDVベクターの作製

NDワクチンに対する血清抗体存在下でNDVを継代培養することにより、抗体による感染防御をエスケープする変異株の選抜を試みた。そのためにNDワクチン株であるHitchner B1株に対するニワトリ抗血清（中和抗体価250倍）を2倍ずつ階段希釈し、104および103 EID50のNDVに加え、ニワトリ胎児線維芽細胞(CEF)に感染させ、各希釈区における感染の有無を評価した。その結果、104 EID50のNDVと28希釈した抗血清の混合区においてウイルスの感染が確認できた。そこで、感染が成立した希釈区（104 EID50ウイルス/ 28希釈抗血清）およびその直前の希釈区（104 EID50ウイルス/ 27希釈抗血清）の培養上清よりウイルスゲノムRNAを抽出し、RT-PCRのよりHN遺伝子の塩基配列を解読したが、共通したアミノ酸変異は見られなかった。

そこで、発表論文を参考として、ワクチン接種したニワトリから分離されたウイルスのFおよびHN遺伝子に多く見られるアミノ酸変異を選抜し、当該アミノ酸を導入したcDNAクローンのシリーズを作製し、細胞に導入するリバースジェネティクス法により、組換えウイルスの作出を試みた。最初に抗NDV抗体に対するエスケープ変異が示唆されているアミノ酸変異F遺伝子（K78R）、HN遺伝子（N263K、E347G、I514V）を導入した組換えウイルスを作出した。当該変異ウイルスを用いて、抗NDV中和血清存在下での感染性を評価したところ、HI価は元のワクチン株と比較して4倍以内の低下にとどまり、明確なエスケープウイルスとは判定できなかった。そこで、上記4つのアミノ酸に加えて（エスケープ性に重要と考えられる）HN遺伝子のアミノ酸変異（N323D、M354K）を導入した組換えウイルスを作製した（図10）が、HI価の低下は上記変異ウイルスと同程度であり、明確なエスケープウイルスとは判定できなかった。

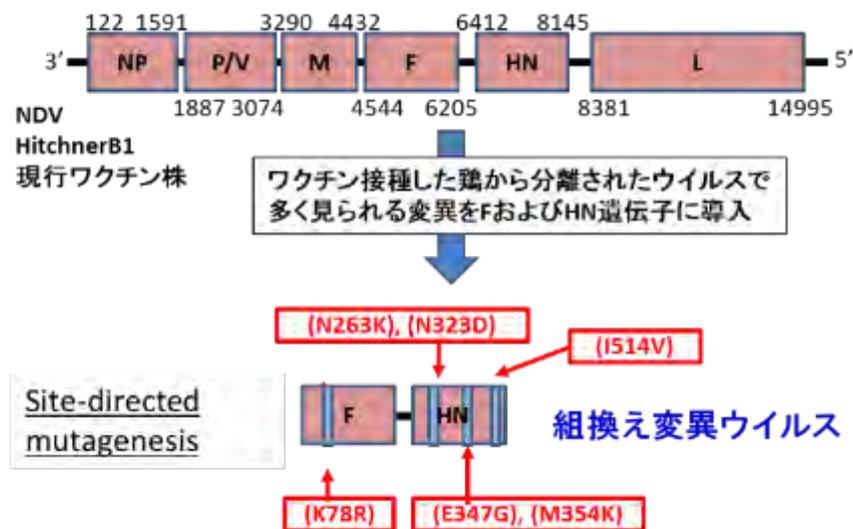


図10 NDV cDNAクローンを用いたsite-directed mutagenesis法による遺伝子変異導入

これらの結果より、一定のエスケープ性を有する組換えNDVの作製には成功したものの、当初の目的である「NDワクチンによる免疫下でも増殖可能なワクチンベクターの開発」を達成するには至らなかった。したがって以降は、本プロジェクトにおいてリバースジェネティクス系が確立したAPMV-2およびAPMV-10の外被タンパク質を有する（NDVを基盤とした）キメラウイルス作製を試みた。

②他の血清型のAPMVとのキメラウイルスベクターの作製

キメラウイルス作製のための技術基盤確立を目指してNDVベクターを用いた (single round 増殖型) シュードウイルスベクターの作製を試みた。最初にNDVのF遺伝子を欠損したcDNAクローンを作製した。さらに、APMV-2およびAPMV-10のF、HN発現ベクターを構築した。APMV-2、APMV-10のFおよびHNタンパク質の発現は各ウイルス免疫ニワトリ血清を用いて確認した (図1 1)。また、抗NDV血清におけるAPMV-2、APMV-10のFおよびHNタンパク質 (抗原) 間に対する交差反応性は見られなかった (図1 2)。

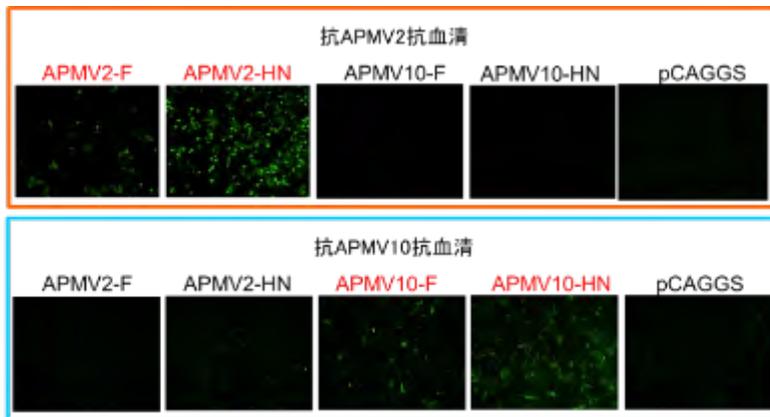


図 1 1 抗APMV2抗血清、抗APMV10抗血清を用いたIFA試験

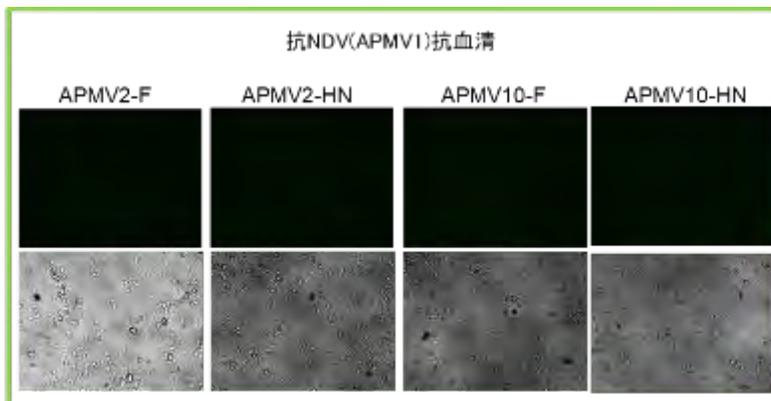


図 1 2 抗APMV1 (NDV) 抗血清を用いたIFA試験

上記のNDVのF遺伝子をtransに供給するシュードウイルス作製システムを用いて、APMV-2、APMV-10のFタンパク質をtransに供給するシュードウイルス (de1FNDV+APMV-2F, de1FNDV+APMV-10F) の感染性を評価した。その結果、コントロールとしたde1FNDV+APMV1 (NDV)Fの明確な細胞内増殖が評価できず、また、de1FNDV+APMV-2F, de1FNDV+APMV-10Fシュードウイルスの細胞内増殖も確実に評価できなかった (図1 3)。そこで、並行して進めていたcis供給システム (キメラウイルス) のcDNAクローンの構築に集中することとした。

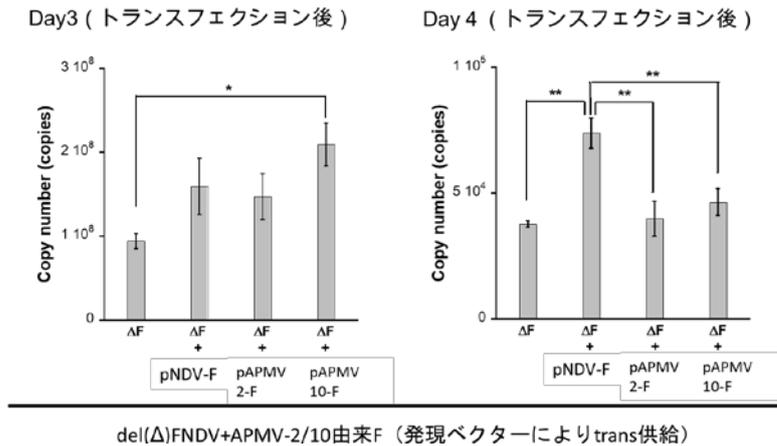


図 1 3 del(Δ)FNDV+APMV-2/10由来Fシュードウイルスの増殖性評価

シュードウイルスを用いた結果を参考に、キメラウイルス作製にはFの置換だけではなく、F-HN両遺伝子を置換したcDNAクローンを作製した。遺伝子組換えには従来の制限酵素部位によるクローニングから任意の位置にディレクショナルクローニングが可能なIn-Fusionクローニング法に切り替えた(図14)ことにより、cDNA作製のスピードアップが可能となった。

APMV-2およびAPMV-10のFあるいはHN遺伝子を各々NDV(cDNAクローン)と置換したキメラcDNA、およびAPMV-2およびAPMV-10のF-HN両遺伝子をNDV(cDNAクローン)と置換したキメラcDNAを作製した(図14)。これらcDNAクローンをNDV組み換えウイルス作出法に準じてHEp2細胞に導入し、トランスフェクション細胞およびその培養上清を発育鶏卵に接種し、(キメラ)ウイルスの増殖の有無を評価した。

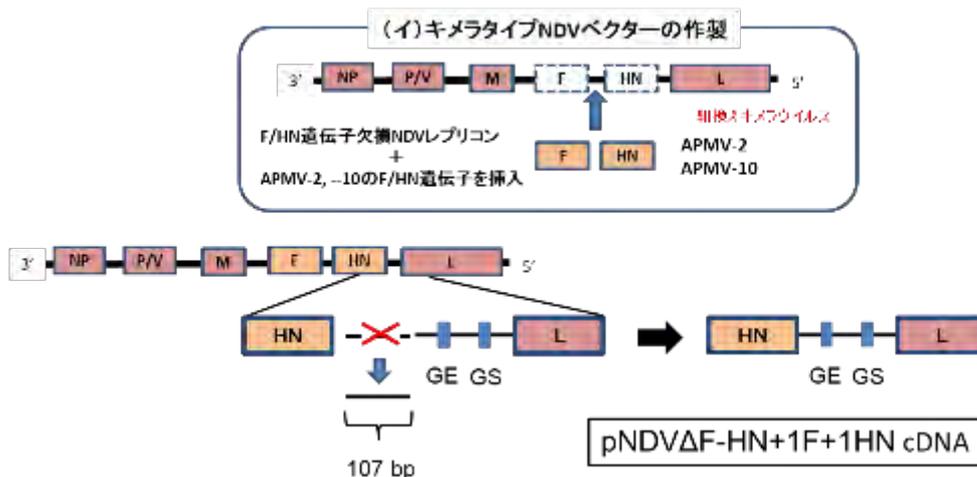


図 1 4 組換えキメラウイルス作製のための感染性cDNAクローン

その結果APMV-2のF-HN遺伝子をNDV(cDNAクローン)と置換したキメラcDNAから感染性を有するキメラウイルス(rNDV ΔF-HN+2F+2HN)の作出に成功した。さらに、APMV-2のHN遺伝子のみをNDVと置換したキメラウイルス(rNDV ΔF-HN+1F+2HN)の作出にも成功した(図15、16)。いずれのキメラウイルスも、ウイルス粒子の外側(エクトドメイン)のみならず、膜貫通領域と粒子内領域(TM-CT)もAPMV-2由来であり、TM-CT領域をNDV由来とする必要はなかった。両キメラウイルスともに培養細胞および発育鶏卵中ではコントロール(親)ウイルス(rNDV-1F1HN)と同程度に増殖した(図17、18)。一方、他のキメラcDNAクローンについては複

数回の作出（レスキュー）を試みたが成功しなかった。

得られたキメラウイルスを用いて、抗NDV中和血清存在下での感染性をin vitro（細胞株）およびin vivo（発育鶏卵）感染試験により評価した。その結果、抗血清原液存在下においてもキメラウイルスの増殖は阻害されなかった（図19、20）。

以上のことから、研究目標であった「NDワクチンによる免疫下でも増殖可能な遺伝子改変NDV」の候補ウイルスを作出することができた。

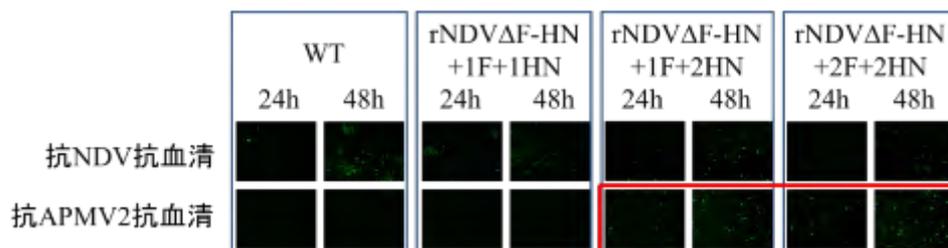


図16 組換えキメラウイルス（rNDVΔF+HN+1F+2HN、rDVΔ-HN+2F+2HK）

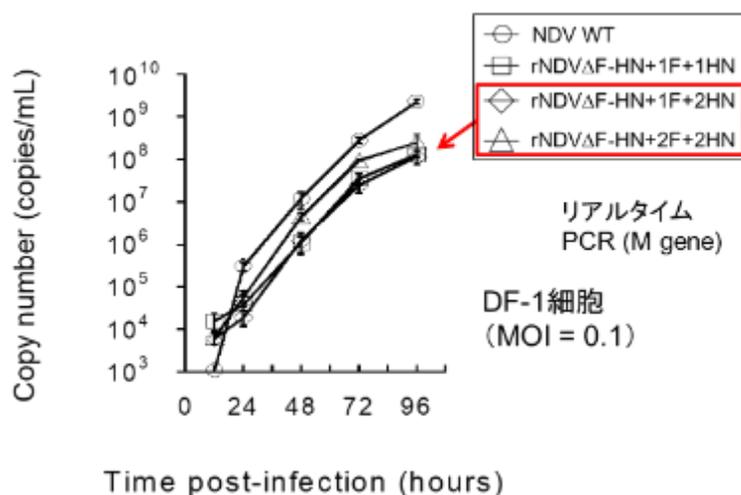


図17 組換えキメラウイルスのin vitroの増殖試験

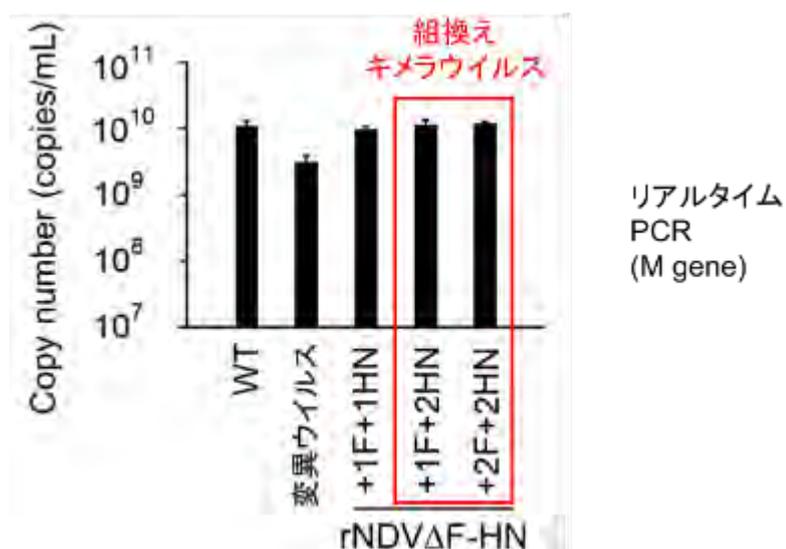


図18 組換えキメラウイルスのin vivo（発育鶏卵）増殖試験

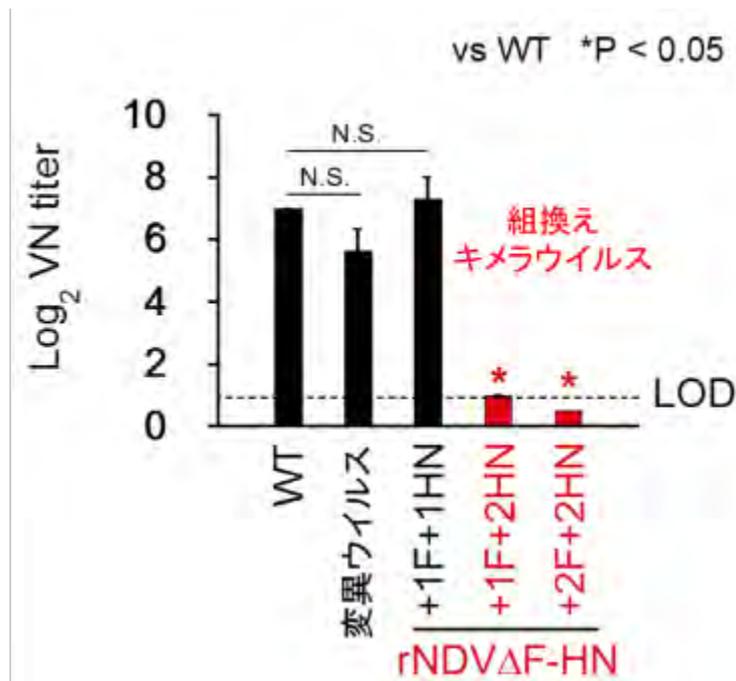


図 19 抗NDF抗血清を用いたin vitro中和試験

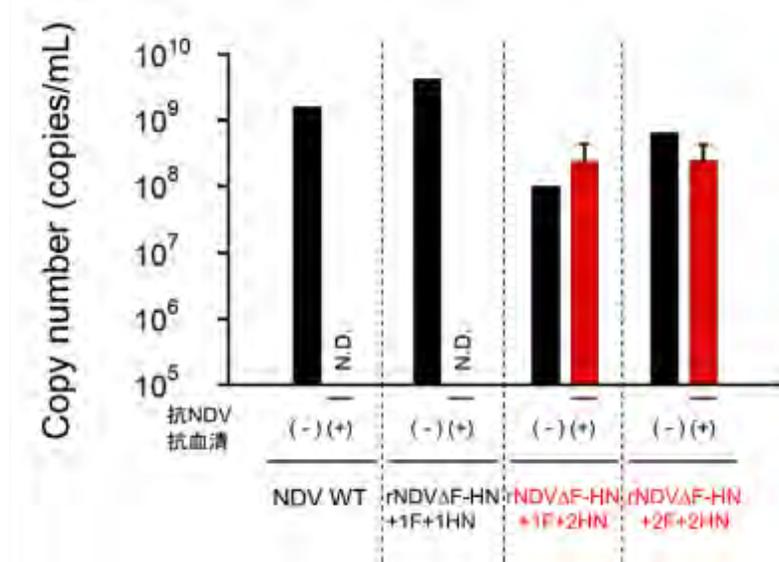


図 20 抗NDV血清を用いたin vivo (発育鶏卵) 中和試験

・動物インフルエンザウイルス予防に向けたユニバーサルワクチンの開発

異なる亜型のインフルエンザウイルスが豚に同時感染してしばしば形成される遺伝子再集合体が豚から人へ伝播し、パンデミックを起こす可能性が近年危惧されている。そこで、異なる亜型の同時感染を防除する“ユニバーサル”ワクチンの開発に向け、インフルエンザウイルスの共通抗原に対する免疫応答を豚において強力に誘導できるワクチン手法を開発する。

①ワクチン候補株の検討

豚インフルエンザワクチンに使用する候補株を選別するため、近年日本で分離されたパンデミックSIV A/sw/Yamagata/11/2010(H1N1)、古典的SIV A/sw/Tochigi/1/2008(H1N2)およびリアソータントSIV A/sw/Tochigi/1/2012(H1N2)を5週齢の豚に感染させ、豚の臨床症状、体

重およびウイルスの排泄を調べた。

A/sw/Tochigi/1/2012 (H1N2)を感染させた豚は、くしゃみおよび下痢の症状が確認され、体重増加率は111.8%と、PBSを接種した群の124.9%に比べ低かった。一方、A/sw/Yamagata/11/2010 (H1N1)およびA/sw/Tochigi/1/2008 (H1N2)を感染させた豚では、顕著な症状は確認されず、体重増加率も121.0%および121.6%とPBS接種群と顕著な差は確認されなかった。ウイルスの排泄は、ウイルスを接種した全ての豚で鼻腔スワブより確認され、A/sw/Tochigi/1/2012 (H1N2)を接種した豚が最もウイルス力価が高かった (図1)。

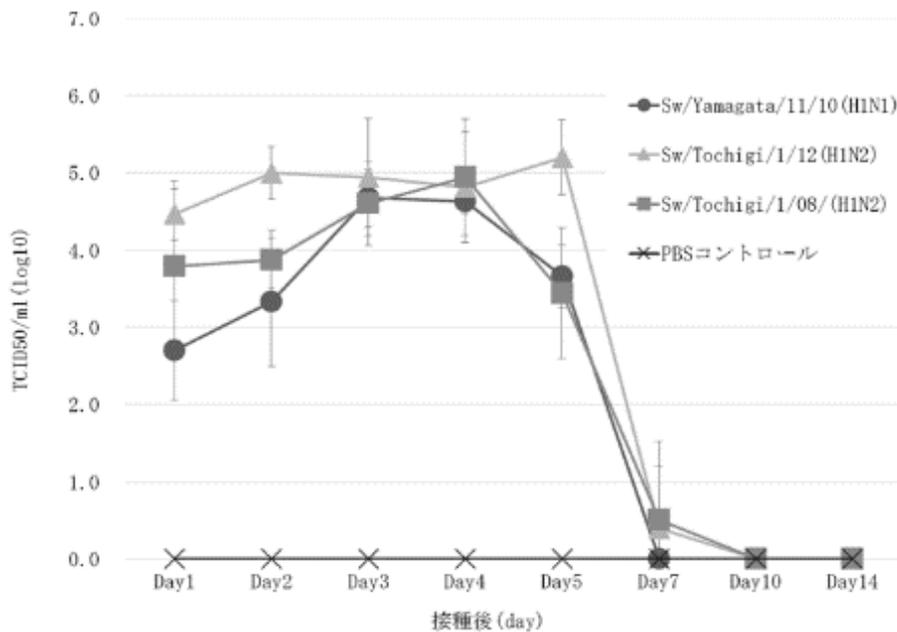


図1 SIV接種後の鼻腔スワブ中のウイルス量

②DNAワクチンの作製

インフルエンザウイルスの抗原性に影響されないワクチンを作製するため、インフルエンザウイルスの共通抗原であるHAタンパク質のHA2領域およびM2タンパク質のM2e領域を抗原として発現するDNAワクチンを作製した。

HA2およびM2e領域をコードする遺伝子は、豚インフルエンザウイルスA/swine/Tochigi/1/2012 (H1N2)の各遺伝子をブタのコドンに最適化したものを使用し、タンパク質発現用ベクター-phCMVのCMVプロモーター下流にIL-2分泌シグナルとともに挿入することにより、HA2発現プラスミドおよびM2e発現プラスミドを作製した (図2)。また、抗原タンパク質の発現を安定化するためM2eとHA2を連結して挿入したM2e-HA2発現プラスミドを、豚での免疫誘導効果を増強するためブタIL-2遺伝子を挿入したIL-2発現プラスミドを作製した。

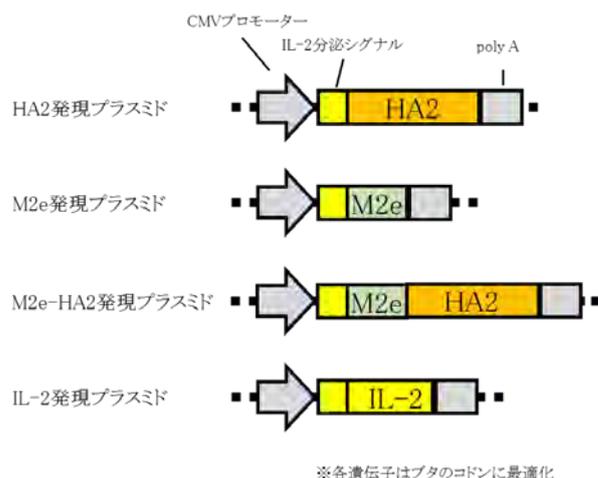


図2 DNAワクチンプラスミドの模式図

③DNAワクチンの豚培養細胞における抗原発現

作製したタンパク質発現プラスミドを豚の精巣株化細胞にトランスフェクションすることにより、in vitroでの抗原タンパク質の発現を調べた。抗原タンパク質の発現は、HA2の検出に抗HA2モノクローナル抗体を、M2eの検出には抗M2eペプチド血清を用い、キャピラリー電気泳動免疫アッセイにより特異的なシグナルを検出することで確認した。

HA2発現プラスミドおよびM2eとHA2を連結したM2e-HA2発現プラスミドをトランスフェクションした豚精巣細胞および細胞培養上清においてHA2タンパク質が確認された(図3)。M2e発現プラスミドをトランスフェクションした豚精巣細胞では、M2eタンパク質は確認できなかったが、M2e-HA2発現プラスミドをトランスフェクションした豚精巣細胞では、HA2タンパク質およびM2eタンパク質が確認された(図4)。これにより、豚の細胞において抗原タンパク質としてHA2およびM2e-HA2を発現するDNAワクチンを構築することに成功した。

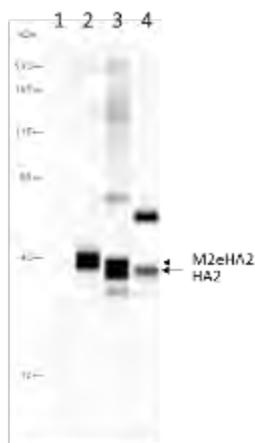


図3 豚精巣株化細胞におけるHA2の発現

1 : phCMVトランスフェクション細胞、2 : phCMV-M2eHA2トランスフェクション細胞、3 : phCMV-HA2トランスフェクション細胞、4 : chCMV-HA2トランスフェクション細胞培養上清



図4 豚精巣株化細胞におけるM2の発現

1 : phCMVトランスフェクション細胞、2 : phCMV-M2eHA2トランスフェクション細胞

(3) 効果的なワクチン戦略のための動物インフルエンザの動向監視

実施課題(3) 効果的なワクチン戦略のための動物インフルエンザの動向監視

国内外で流行するインフルエンザウイルスの遺伝子解析等を行って、流行状況を把握してきた。2013年7月-11月にベトナム・ホーチミン分離H5N1亜型HPAIVの全ゲノム解析で、新たな遺伝子再集合ウイルスの存在を明らかにした(表1)。ホーチミンで主に流行していたクレード1.1のウイルスと新たに導入されたクレード2.3.2.1Cの内部遺伝子分節が、クレード2.3.2.1Aウイルス由来遺伝子分節に変わっていた。

表1 2013年7月-11月ベトナム・ホーチミンで分離されたH5N1亜型HPAIVの全ゲノム解析

Virus name	Sampling Date	Clade of each gene							
		HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
A/Chicken/Tien Giang/6932/2013(H5N1)	2013/7/15	1.1	1.1	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A
A/Chicken/Ba Ria Vung Tau/10263/2013(H5N1)	2013/8/12	1.1	1.1	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A
A/Quail/Tien Giang/9882/2013(H5N1)	2013/7/30	1.1	1.1	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A
A/Duck/Tien Giang/15421/2013(H5N1)	2013/11/26	2.3.2.1C	2.3.2.1C	2.3.2.1A	2.3.2.1C	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1A	2.3.2.1C

また、2014-2015年冬季に日本で分離されたH5N8亜型HPAIVは、WHO/OIE/FAO H5 Evolution Working GroupのHA遺伝子分節における分類ではクレード2.3.4.4に属することが明らかとなったが、日本の家禽を中心に認められる亜系統、主にヨーロッパ又は北アメリカ大陸で認められる亜系統の3つの亜系統に分類されることが明らかとなった(図1)。2016-2017年のH5N6亜型日本発生株のHA遺伝子分節もクレード2.3.4.4に属していたが、PA及びNS遺伝子分節の組み合わせにより5つの遺伝型に分類されることが示された(図2)。

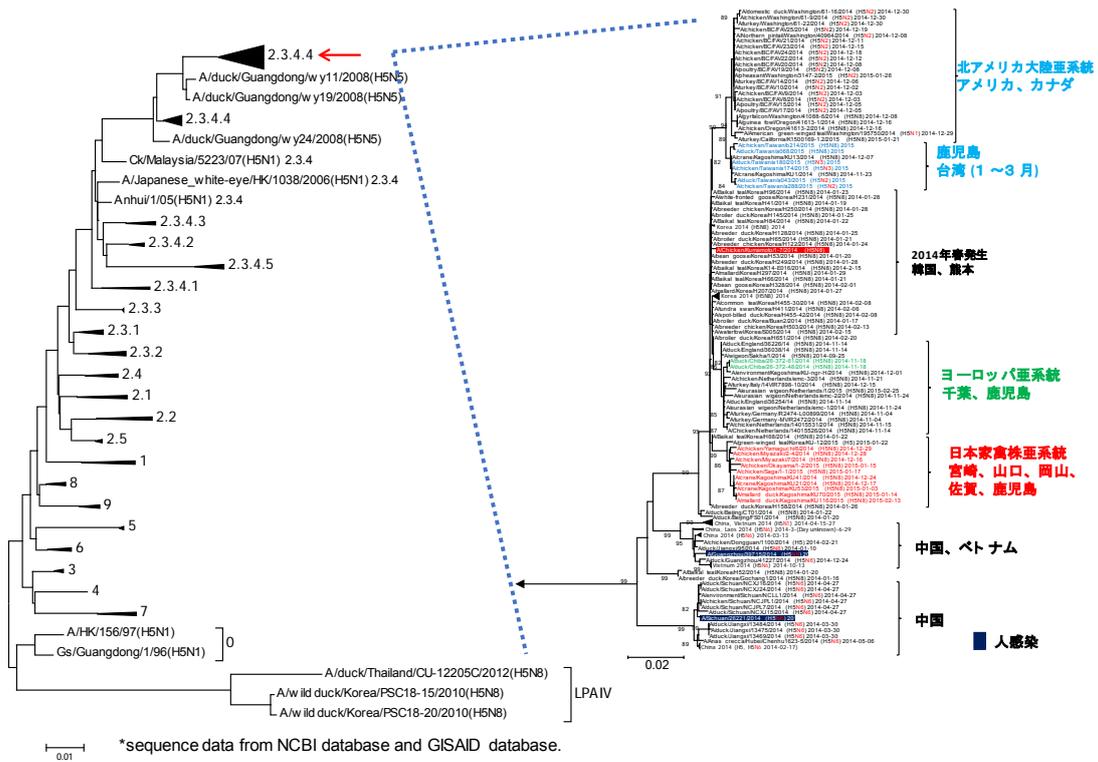


図1 2014-2015年日本分離株HA遺伝子分節の遺伝系統学的解析

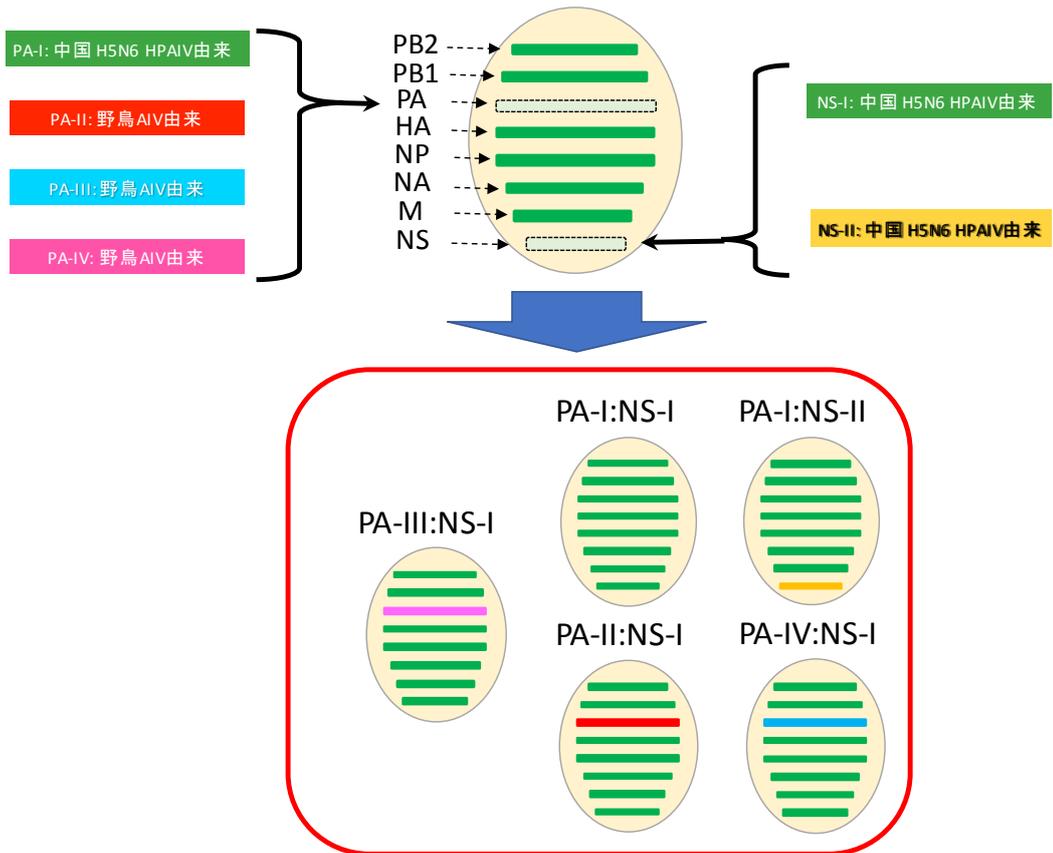


図2 2016-2017年に国内で分離されたH5N6HPAIVの遺伝型

様々な流行状況の情報を元に、台湾、韓国、アメリカからはH5及びH7亜型低病原性及び高病原鳥インフルエンザウイルスをそれぞれ16株、4株及び4株導入した。また、日本の動物検疫所にて旅客の携行品から分離されたHPAIVを含む鳥インフルエンザウイルス株も10株導入した。2013年、中国の人でのH7N9亜型の発生を踏まえて迅速にA/Anhui/1/2013株を国立感染症研究所を通して導入し、さらにそのウイルスから派生した高病原性株が2016年から確認され、中国及び台湾の人由来及び動物検疫所から家禽由来H7N9亜型HPAIVも導入した（表2）。

表2 国内侵入が危惧される海外からのインフルエンザウイルスの導入

	株名	亜型			病原性	H5亜型 遺伝子型
		H5	H7	その他		
台湾	A/chicken/Taiwan/1209/2008	H5N2			LP	アジア型
	A/chicken/Taiwan/K703-1/2008	H5N2			LP	アジア型
	A/chicken/Penghu/1103/12	H5N2			HP	アジア型
	A/chicken/Chungshu/A1029/10	H5N2			HP	アジア型
	A/chicken/Tainan/A1997/12	H5N2			HP	アジア型
	A/chicken/Yunlin/0502/12	H5N2			HP	アジア型
	A/chicken/Chungshu/0101/12	H5N2			HP	アジア型
	A/duck/Taiwan/CH/a48/2015	H5N2			HP	アジア型
	A/chicken/Taiwan/YL/a24/2015	H5N2			HP	アジア型
	A/goose/Taiwan/YL/a4/2015	H5N2			HP	アジア型
	A/duck/Taiwan/PT/a130/2015	H5N8			HP	アジア型
	A/chicken/Taiwan/PT/a174/2015	H5N8			HP	アジア型
	A/goose/Taiwan/9H/a42/2015	H5N8			HP	アジア型
	A/duck/Taiwan/OY/a23/2015	H5N8			HP	アジア型
	A/chicken/Taiwan/CH/a29/2015	H5N8			HP	アジア型
	A/goose/Taiwan/PT/a14/2015	H5N8			HP	アジア型
韓国	A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014	H5N8			HP	アジア型
	A/broiler duck/Korea/Busan2/2014	H5N8			HP	アジア型
	A/domestic mallard duck/Korea/H1924/2014	H5N8			HP	アジア型
	A/mallard/Korea/H2102/2015	H5N8			HP	アジア型
アメリカ	A/gyrfalcon/Washington/41063-6/2014	H5N8			HP	アジア型
	A/turkey/Minnesota/9845-4/2015	H5N2			HP	アジア型
	A/Northern pintail/Washington/40964/2014	H5N2			HP	アジア型
	A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016		H7N9		HP	アジア型
中国由来*	A/duck/Japan/Animal Quarantine-HE72/2015	H5N6			HP	アジア型
	A/chicken/Japan/Animal Quarantine-HE79/2015	H5N1			HP	アジア型
	A/chicken/Japan/Animal Quarantine-HE144/2016	H5N6			HP	アジア型
	A/duck/Japan/Animal Quarantine-HE-23-8/2016		H7N9		LP	
	A/duck/Japan/AQ-HE29-22/2017		H7N9		HP	
	A/duck/Japan/Animal Quarantine-HE5/2015			H5N2	AI	
	A/chicken/Japan/Animal Quarantine-HE14/2015			H5N2	AI	
	A/duck/Japan/Animal Quarantine-HE23/2015			H5N2	AI	
中国ヒト 由来**	A/Anhui/1/2013		H7N9		LP	
	A/Taiwan/1/2017 (H7N9)		H7N9		HP	
	A/Guangdong/178F003/2016 (H7N9)		H7N9		HP	

世界のHPAIVの流行状況を把握し、HA遺伝子の進化の系統樹解析を行い、流行株を用いた診断用抗血清を作製した。新たに確認されたがウイルスの迅速な導入が難しい中国のクレード7.2のH5亜型HPAIVについて、遺伝子情報からウイルスの抗原性を保持した人工ウイルスを作製した（図3）。このように作製した人工ウイルス、海外から導入したウイルス及び遺伝子解析結果を行って候補となったウイルスについて、合計28種類の抗血清を作製した（表3）。それらの抗血清は、ワクチン研究の為のウイルス抗原性解析や2007-16年分離ベトナムの

HPAIVの抗原解析に用いられた。ベトナムでは同じ遺伝子系統間で抗原変異があることを明らかにした(表4)。また、2016-2017年H5N6亜型HPAI発生後、いち早く国内の流行ウイルス株の抗血清を作製して抗原解析を行い、国内備蓄ワクチンの効果確認前の参考資料として提供された(表5)。

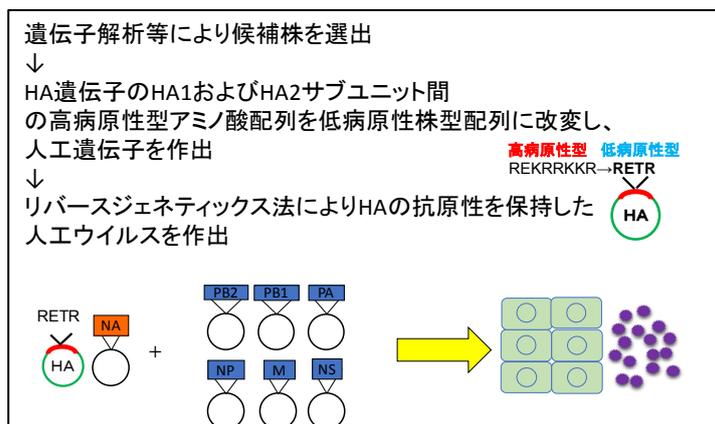


図3 入手困難なウイルスの人工的作製方法

表3 診断及びワクチン株選定抗原解析用抗血清の作製

国名	株名	遺伝子型	抗原解析用抗血清の作製	ワクチン株選定	
中国	A/chicken/Hong Kong/1/2014	H5N6	100	100	
台湾	A/chicken/Taiwan/0202/2015	H5N6	100	100	
韓国	A/duck/daegu/01/2014	H5N6	100	100	
日本	A/chicken/Kanagawa/1-1/2014	H5N6	100	100	
	A/chicken/Hokkaido/1/2014	H5N6	100	100	
	A/duck/Chiba/24-07-01/14	H5N6	100	100	
	A/duck/Asahikawa/10-06-01/2014	H5N6	100	100	
	A/duck/Asahikawa/10-07-27/2014	H5N6	100	100	
	A/duck/Asahikawa/10-07-27/2014	H5N6	100	100	
	A/duck/Kanagawa/10-07-17/2014	H5N6	100	100	
ベトナム	A/chicken/Tien Giang/022/2015	H5N6	100	100	
	A/duck/Quang Nam/08-01/2015	H5N6	100	100	
	A/duck/Quang Nam/08-09/2015	H5N6	100	100	
	A/chicken/Tien Giang/0208/2015	H5N6	100	100	
	A/duck/Thanh Thuan/001/2015	H5N6	100	100	
	A/duck/Quang Nam/054/2014	H5N6	100	100	
	A/chicken/Tien Giang/0206/2015	H5N6	100	100	
	A/chicken/Thanh Long/0007/2015	H5N6	100	100	
	A/chicken/Bien Hoa/014/2015	H5N6	100	100	
	A/duck/Tay Ninh/020/2015(0001)	H5N6	100	100	
	A/chicken/Thanh Lap/0027/2015	H5N6	100	100	
	A/chicken/Quang Nam/001/2015	H5N6	100	100	
	中国	A/duck/1/2015	LP	100	100
	中国	A/duck/Jiangsu/01/01/2016	LP	100	100
	中国	A/Taiwan/1/2015	H5N6	100	100
中国	A/Quangdong/1701/2016	H5N6	100	100	
中国	A/duck/Japan/03-01-23/2017	H5N6	100	100	
韓国	A/duck/Gyeongsang/000/2015	LP	100	100	
アメリカ	A/duck/Indiana/10-001/01-01/2016	H5N6	100	100	

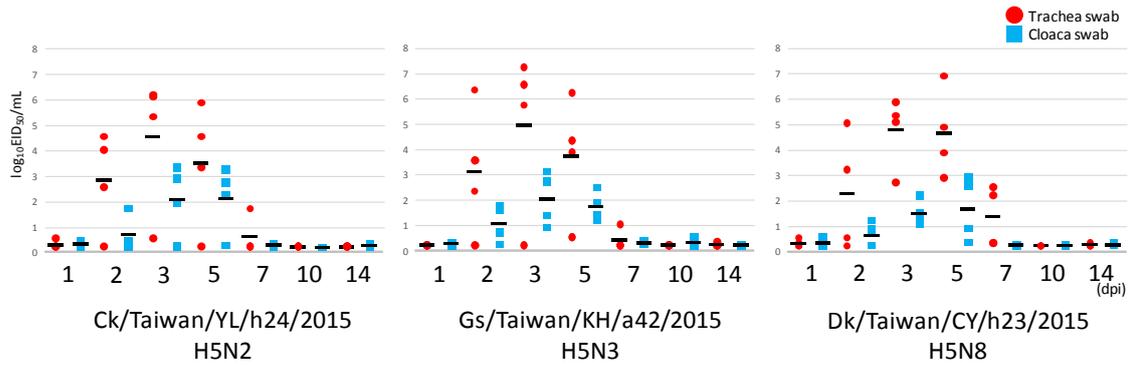


図5 台湾のH5亜型HPAIV感染アヒルのウイルス排泄量

	感染数/生存数/供試個体数	感染数/生存数/供試個体数	感染数/生存数/供試個体数
6	15/15/15	4/4/4	1/4/4
4	2/4/4	4/3/4	2/3/4
2	0/4/4	4/4/4	2/5/5

接種したウイルス力価 log₁₀EID₅₀/羽

A/Anhui/1/2013株を 経鼻接種

図6 2013年ヒト分離H7N9亜型インフルエンザウイルス経鼻接種鳥類の生存率と感染率



図7 H7N9亜型HPAIVのA型検出簡易キットの気管及びクロアカスワブでの反応性

日中農業科学技術交流グループ会議等を活用し、中国との交流が進展した結果、2014年に中国およびWHOとともにシンポジウム「One Healthから見た動物インフルエンザ」を開催し、各国の動物インフルエンザに関する情報を得た。2016年にはシンポジウム「鳥インフルエンザと野生動物」において、韓国でのHPAIVの状況に関する情報収集した。ロシアのノボシビルスク大学と及び連邦国立公共機関連邦動物健康保護センター (FGBI ARRIAH)と野鳥での鳥インフルエンザ研究に関するMOUを結んだ。

2015年、国内鳥インフルエンザ診断用コンベンショナルPCR法について、従来法よりも約2-20倍程度感度が上昇する系に変更した(表6)。2016年11月に確認された野鳥感染事例のウイルス遺伝子解析を1週間以内に行い、家禽診断用プライマーを事前に設計し、2016-2017年の家禽でのHPAI発生並びに野鳥感染事例の診断に活用した。2017年11月に日本の野鳥で分離されたH5N6亜型HPAIVウイルスを家禽発生に備えて即座に導入し、診断系の確認を行った。

表6 鳥インフルエンザ診断用コンベンショナルPCR法の変更の為の検討

ウイルス株名	亜型		検出限界 $\times \log_{10} EID_{50}/ml$			
			NP		亜型特異的プライマー	
			HA	NA	既存	新規
A/w swan/Shimane/580/2002	5	3	1.25	0.83	2.25	2.83
A/duck/Tsukuba/419/2005	5	3	0.83	0.41	1.83	1.41
A/chicken/Ibaraki/1/2005	5	2	1.50	1.08	2.50	2.08
A/duck/Tsukuba/189/08	5	2	1.68	1.26	2.68	2.26
A/duck/Chiba/4/2009	5	3	0.83	0.41	2.83	1.41
A/spot-billed duck/Fukuji/131811/2013	5	3	1.63	1.21	1.63	1.21
A/whistling swan/Shimane/42/80	7	7	0.50	0.08	2.50	2.08
A/quail/Aichi/1/2009	7	6	1.17	0.75	6.17	4.75
A/duck/Gunma/466/2011	7	9	2.25	0.83	4.25	2.83
A/duck/Tsukuba/30/07	7	7	0.50	1.08	3.50	2.08
A/duck/Chiba/25-51-14/2013	7	1	2.17	2.75	4.17	3.75
A/chicken/NJ/15086-3/1994	7	3	2.00	1.58	5.00	3.58
A/chicken/NY/119055-7/01	7	2	1.50	2.08	4.50	4.08
A/Turkey/Minnesota/14135-4/2009	7	9	1.38	0.96	4.38	3.96

(4) 動物インフルエンザウイルスに対する宿主応答とウイルス遺伝子の相互作用
 実施課題(4) 動物インフルエンザウイルスに対する宿主応答とウイルス遺伝子の相互作用

・HPAIVの病原性発現に關与するウイルス遺伝子解明

HPAIV由来のHAとNA遺伝子を持ち、野鳥または鶏由来鳥インフルエンザウイルス(AIV)の内部遺伝子を持つ人工ウイルス(WB、LP)及びPB1遺伝子をそれぞれ入れ替えたWB(LP/PB1)、LP(W/PB1)に、WBとLPのPB1タンパク質で差のある38番目のアミノ酸を置換させた人工ウイルスを作製し、それらウイルスを用いた鶏への感染実験から、38番目のアミノ酸置換(Y38C)は鶏に対するウイルスの病原性及び伝播性を減少させることを明らかにした(図1、2)。

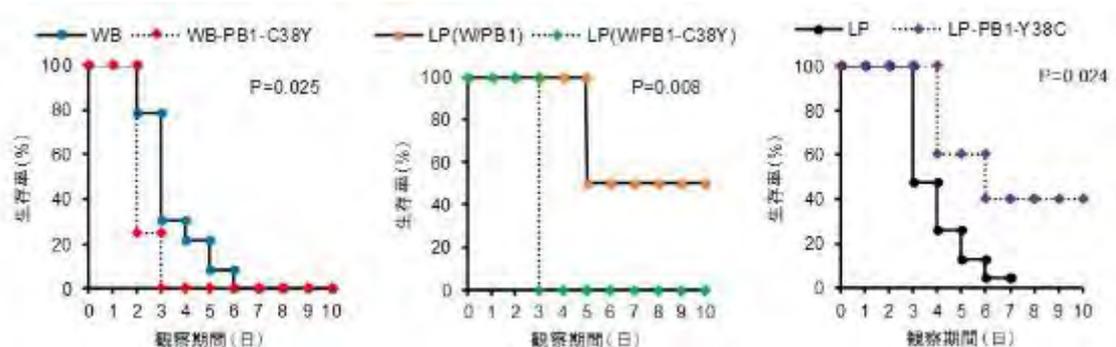


図1 人工ウイルスを鶏に感染させたときの生存率

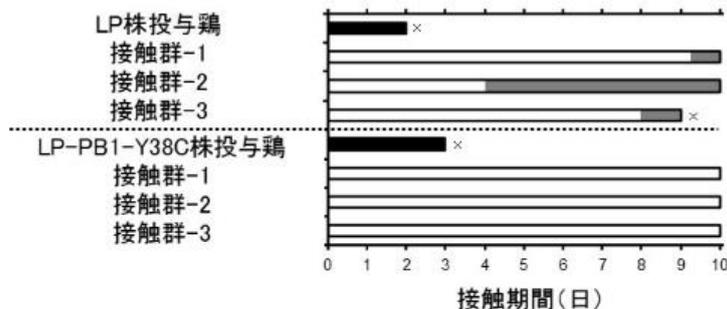


図2 人工ウイルスの鶏伝播性（黒、灰色掛け期間にウイルスが回収されている）

HPAIV由来のHAとNA遺伝子を持ちながら鶏への病原性が低い人工ウイルスLP(W/PA)E0を発育鶏卵で継代を繰り返すことによって得られたウイルスLP(W/PA)E16は、鶏への病原性が復帰し、アミノ酸置換がウイルスポリマーゼサブユニットのPAに3カ所、ウイルス表面タンパク質のHAに1カ所存在することを明らかにした（表1）。PAタンパク質に見られたアミノ酸置換(I54F)を導入した人工ウイルスLP(W/PA F₅₄)を作製し、そのウイルスを用いた鶏への感染実験から、54番目のアミノ酸置換(I54F)は、鶏に対する病原性上昇に関わることを明らかにした（表1）。また、HA遺伝子における変異が病原性の低下に関与する可能性が考えられた。

表1 LP(W/PA)E16で見られた各種アミノ酸置換変異と鶏病原性の変化

	PAタンパク質におけるアミノ酸置換部位#			HAタンパク質における置換部位#	生存率(%)	
	54	65	115	160	静脈内接種	経鼻接種
LP(W/PA)E0	I	S	N	A	100.0	100.0
LP(W/PA)E16	I/F	S/P	N/S	T	0.0	20.0
LP(W/PA F ₅₄)	F				50.0	0.0

LP(W/PA)E0と同じアミノ酸を持つ場合は省略

・HPAIVの病原性発現に関与する鶏自然免疫関連分子の解析

HPAIV感染で発現上昇する鶏USP18遺伝子について、鶏培養細胞からクローニングを行い、その発現誘導因子について解析を行ったところ、I型インターフェロン(IFN I)が鶏USP18発現を誘導することを明らかにした（図3）。また、鶏USP18遺伝子の発現を抑制した培養細胞をIFN Iで刺激後、H9N2亜型AIVを感染させるとウイルス増殖が抑制されたことから、鶏USP18はAIV増殖を促進させることを明らかにした（図4）。

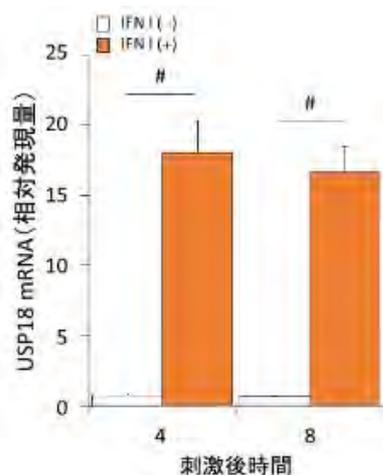


図3 IFN Iで誘導される鶏USP18遺伝子

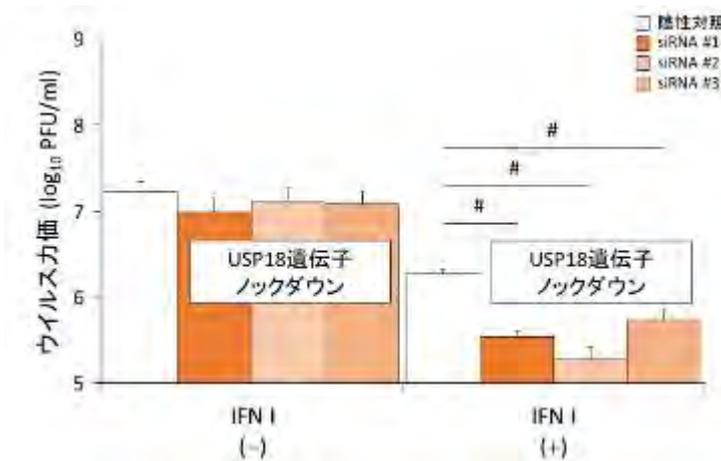


図4 USP18発現を抑制（ノックダウン）した鶏細胞におけるウイルス増殖

自然免疫関連遺伝子を導入した遺伝子改変モデル鶏の作出を目指し、培養始原生殖細胞に特定の自然免疫関連遺伝子を搭載したウイルスベクターを感染させたところ、9羽の当該遺伝子導入鶏の作出に成功した（図5）。



図5 自然免疫関連遺伝子導入鶏（黒羽装）

3) 成果活用における留意点

HPAIVに対するワクチンアジュバントとしてザイモサンを用いることにより、HPAIVの侵入門戸である気管粘膜面への抗体誘導を増強することが明らかとなり、感染防御を可能とする粘膜免疫の付与が期待される。また点眼によるワクチン投与は、確実にハーダー腺を刺激する方法であることが明らかになった。一方で今後、トリの自然免疫の解明と並行して、レセプター応答が抗体産生やTリンパ球の免疫増強に与える影響を評価していく必要がある。

抗インフルエンザ剤の候補としてヒットしたDP2392-E10は、すべての型のインフルエンザのみならず他のウイルスに対してもウイルス複製抑制能を示すシード化合物であったが、実用化にあたっては毒性を低減し、活性を増強するような最適化研究が必要となる。

APMV-10を活用したベクターワクチンはその安全性を検証するため、幼鳥を用いた病原性評価が必要である。ユニバーサルワクチンの開発については、今回のDNAワクチンは、豚の培養細胞で抗原タンパク質を発現することが確認された。

国内外で発生したウイルスの収集により、国内家禽での発生に先立って診断系の検討及びウイルス学的性状解析が可能となり、国内へのウイルスの侵入に際にそれらの情報に基づいた対応が行われた。海外との交流も一段と深められた。

HPAIVの病原性発現に関与するウイルス遺伝子についてアミノ酸レベルでの病原性解析が進むことは、新たに出現するHPAIVの病原性推定に繋がる可能性がある。

4) 今後の課題

噴霧によるワクチン投与では、点眼に比べて1羽あたりの抗原暴露量が下がることが予想されるため、感染防御を誘導するのに十分な抗原濃度について検討が必要である。また、低い抗原量でも十分な免疫を誘導することが可能となる高い免疫誘導能を有するアジュバントの検討が必要である。さらに、最終的に点眼投与を実用化させるためには、噴霧投与などの実用的な方法を検討する必要がある。今後、抗原投与時間や最低必要抗原濃度の評価に加え、効果的なワクチン効果を得るため、各種サイトカインなどを添加することも検討していく。また、大量の移行抗体の存在により免疫応答抑制現象を起こした雛に対して、作製したモノクローナル抗体を投与する事で免疫抑制を解除させることができれば、日本国内でもワクチンを使用しなくてはならない環境に陥った場合でも、免疫抑制を解除できる可能性があることと、現在、海外でこの問題に直面している諸外国に対しても国際協力として協力する事が可能となる。リード化合物については、今後はDP2392-E10からの構造最適化を行い、容易に合成可能かつ安定で、高活性、低毒性なリード化合物を創製することが求められる。また、得られたリード化合物のin vitro、in vivo実験を実施し、新規抗インフルエンザ薬として開発を進める必要がある。

APMVベクターを用いたAIワクチンについては多頭羽に均一に投与する方法を検討する必要がある。改変NDVベクターを用いたAIワクチンについては、APMV-2においてのみHNの置換で感染性キメラウイルスが作出できたことから、APMV-6-SH、-HN置換キメラウイルスの作製の検討が必要である。また、インフルエンザウイルスHA遺伝子等の外来遺伝子（ワクチン抗原）を組み込んだ上記キメラウイルスを作製し、NDVワクチン免疫済みのニワトリにおけるワクチン効果の評価が求められる。ユニバーサルワクチンについては、豚に直接投与した際のDNAワクチンの効果について、更なる感染実験を行う必要がある。また、使用しているベクターの種類、抗原タンパク質のタンデム発現化等を検討する必要がある。

国内外における株の収集と分析は、今後も継続すべきである。また、緊急対応に備え、公衆衛生に関する事項も含め、国内の研究機関でのウイルスの受け渡しに関する手続きを簡略化することとなった。野鳥の診断を行う大学や動物検疫所等ともウイルスの受け渡しを迅速に行えるような体制を構築することが望ましい。

HPAIVの病原性発現に関与するウイルス遺伝子においては、鶏に対する病原性上昇に関わるPAタンパク質の54番目のアミノ酸置換とポリメラーゼタンパク質の活性変化について解析し、54番目のアミノ酸置換が病原性に関わる原因を明らかにする。またHPAIVの病原性発現に関与する鶏自然免疫関連分子においては、AIVの増殖を促進させるUSP18の作用機序を明らかにする。また、自然免疫関連遺伝子を導入した遺伝子改変鶏については、ホモ接合型 (+/+) の遺伝子改変鶏におけるHPAI感受性評価を行う。

中課題番号	13406421	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4		
中課題名	海外からの侵入が危惧される重要家畜疾病の侵入・まん延防止技術の開発		
小課題名	非定型BSEの発生機序の解明とリスク管理基盤技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	岩丸祥史・農研機構動物衛生研究部門		

1) 研究目的

牛海綿状脳症（BSE）の発生が契機となり、安全な食品に対する国民の関心が高まるとともに、わが国でも食品安全基本法の制定及び食品安全委員会による健康影響評価という、食の安全・安心に関して新しい枠組みが構築された。BSEは肉骨粉の使用規制により世界的に発生の減少が認められている一方、老齢牛に自然発生する可能性がある非定型BSEは、従来型BSEとは異なる病態を示し、散発的に世界中で発生している。今後のBSE 発生防止策とリスク管理措置の妥当性を評価するためには、非定型BSEに関する科学的知見の収集が重要である。また、国内発生が認められない動物プリオン病である非定型スクレイピーおよびシカ慢性消耗病においても、国内監視が重要である。このため、本研究では、

1. 非定型BSEの高感度検出法の開発
2. 非定型BSE経口感染牛の病態解析
3. 非定型BSEプリオンの伝達性に基づく性状解析
4. 非定型プリオン病のサーベイランスとそのリスク評価

により、非定型BSEの発生機序を解明しリスク管理基盤技術の開発を目的とする。

2) 研究成果

実施課題（1） 非定型BSEの高感度検出法の開発

ポリアニオン及びアルギニン化合物を用いたPMCA法により、L型およびH型非定型BSE感染牛に由来するPrP^{Sc}の超高感度検出法を確立した。非定型BSE発症牛では、PrP^{Sc}が全身性に分布し、骨格筋から感染性も認められた。また、未発症牛でも、脳内投与後8ヶ月でPrP^{Sc}が末梢組織から検出されることから、中枢から遠心性にPrP^{Sc}が広がる可能性が考えられた。一方、BSEの感染が成立する前の非定型BSE経口投与牛の末梢組織では、PMCA法でもPrP^{Sc}は検出限界以下であった。

実施課題（2） 非定型BSE経口感染牛の病態解析

平成25年度

L型BSE感染脳1gを経口接種し、接種後15か月および51か月を経過した牛を1頭および4頭を、5gを経口接種し、接種後54か月および70か月を経過した牛を1頭および2頭解剖し、全身諸臓器におけるPrP^{Sc}の体内分布をウエスタンブロット (WB) 法ならびに免疫組織化学的染色 (IHC)

により検索したが、いずれの組織からもPrP^{Sc}は検出されなかった（図1）。

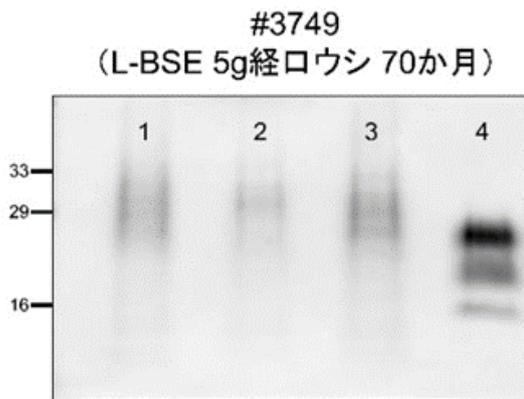


図1 ウェスタンブロット像

1 : obex、2 : 海馬、3 : 視床、4 : マウスコントロール

H型BSE感染脳50gを経口接種後12か月および38か月を経過した牛1頭ずつを解剖し、全身諸臓器におけるPrP^{Sc}の体内分布をWBならびにIHCにより検索したが、いずれの組織からもPrP^{Sc}は検出されなかった（図2）。L型ならびにH型BSEプリオンをホルスタイン種牛に経口接種し、それぞれ接種後70および38か月を経過した牛を解剖し、全身諸臓器におけるPrP^{Sc}の体内分布を精査したが、感染の成立は確認されなかった。

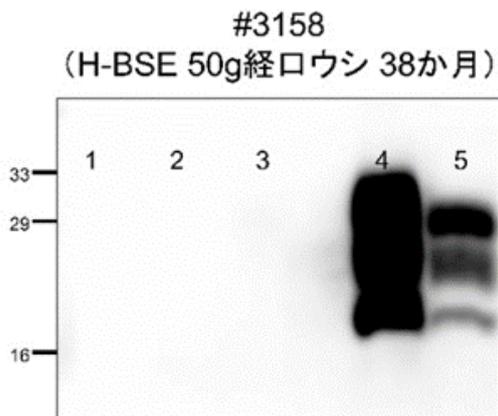


図2 ウェスタンブロット像

1 : obex、2 : 海馬、3 : 視床（以上10mg脳等量/lane）、4 : H-BSE（1mg脳等量）、5 : マウスコントロール

平成26年度

L型BSE感染脳5gを経口接種し、接種後78及び85か月を経過した牛1頭ずつを解剖し、全身諸臓器におけるPrP^{Sc}の体内分布をWBならびにIHCにより検索したが、いずれの組織からもPrP^{Sc}は検出されなかった。

羊で継代したL型BSEを脳内接種したICRマウスは約2年間のマウス生存期間中に発症しなかったが、解剖した15匹中1匹の脳に、さらに15匹中9匹のリンパ系組織（図1）にPrP^{Sc}蓄積が検出され、ARQホモ羊で継代したL型BSEの野生型マウスへの伝達に成功した（図3、4）。

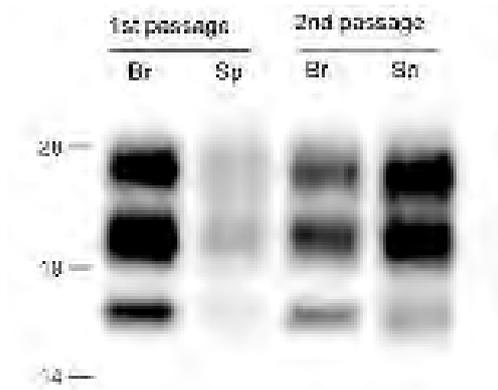


図3 脳と脾臓にPrP^{Sc}が蓄積している

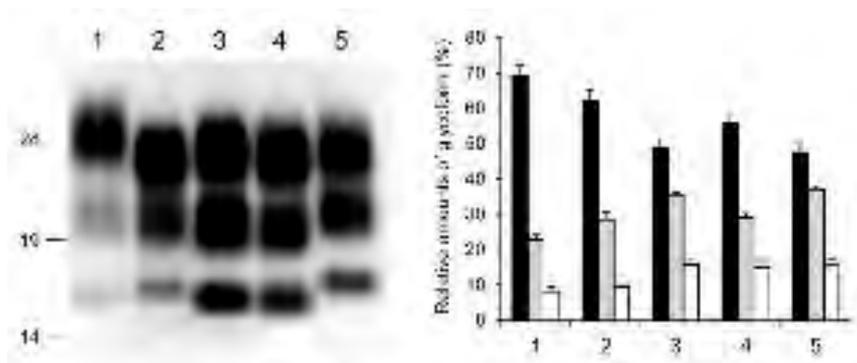


図4 1: cattle C-BSE、2: mouse adapted C-BSE、3: cattle L-BSE、4: sheep L-BSE、5: mouse L-BSE/sheep

平成27年度

L型BSE感染脳10 gを経口接種し、接種後74及び81か月を経過した牛1頭ずつを解剖し、全身諸臓器におけるPrP^{Sc}の体内分布をWBならびにIHCにより検索したが、いずれの組織からもPrP^{Sc}は検出されなかった(図5)。残る接種牛に臨床的变化は観られない。

A₁₃₆L₁₄₁R₁₅₄Q₁₇₁ホモ遺伝子型のチェビオット種雌羊2頭に英国で発生した非定型スクレイピー(AS)感染羊のプール脳乳剤を1mL脳内接種した。接種後7年を経過しても臨床的变化がないことから接種後85か月で剖検し、PrP^{Sc}蓄積の有無をELISA、WBとIHCで検索したところ、IHCで小脳軟膜直下の皮質に顆粒状のPrP^{Sc}が極わずか散在性に検出された(図6)が、ELISAとWBでは陰性であった。

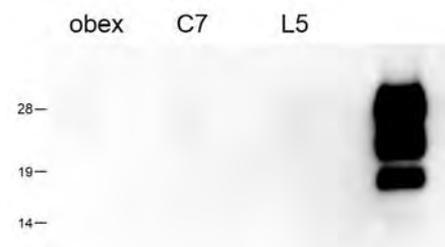


図5 L型BSE感染脳乳剤10 g経口接種牛(81 mpi)でのWB解析
obex: 延髄門部、C7: 頸膨大、L5: 腰膨大

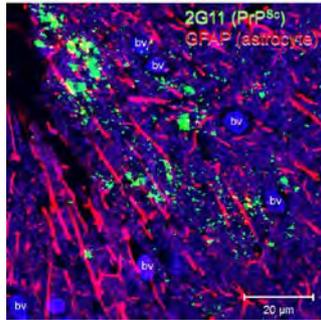


図6 AS脳内接種羊のIHC (85 mpi)
小脳分子層に顆粒状のPrP^{Sc} (緑色) が沈着している。

平成28年度

L型BSE感染脳乳剤50 gを経口接種した牛が接種88か月後に突如起立不能となり斃死した。全身諸臓器にPrP^{Sc}が蓄積していたが、PrP^{Sc}脳内分布は自然発生病牛や脳内接種牛のそれとは異なっていた。L型BSE経口接種による牛への感染の成立が確認された (表、図7、8)。しかしながらリンパ系組織と腸管神経叢にPrP^{Sc}は検出されなかった

表 L型BSE感染脳乳剤経口接種牛一覧

Dose (g)	No. inoculated (No. of alive)	Months after exposure (No. of necropsied)
1	4	51 (2)、 52 (2)
5	6	54 (1)、 70 (2)、 73 (1)、 75 (1)、 82 (1)
10	4	74 (1)、 81 (1)、 85 (1)、 86 (1)
50	2 (1)	88 (1)

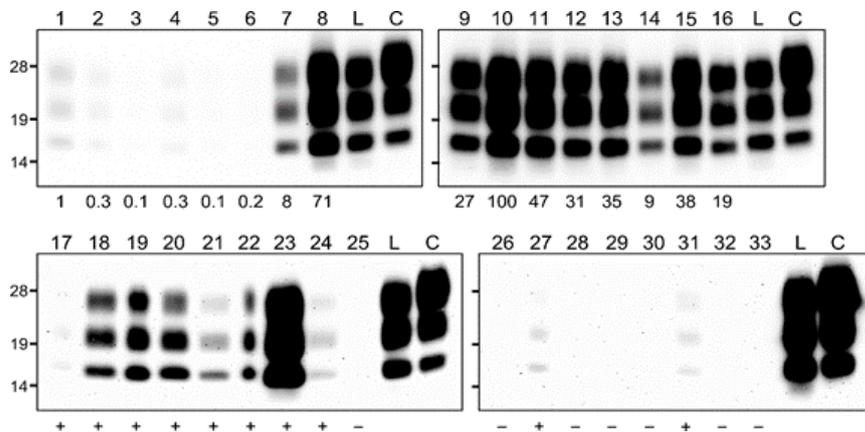


図7 L型BSE感染脳乳剤50g経口接牛 (88 mpi) でのWB解析

1: 嗅球、2: 前頭葉皮質、3: 梨状葉皮質、4: 頭頂葉皮質、5: 後頭葉皮質、6: 海馬、7: 線条体、8: 視床、9: 視床下部、10: 中脳、11: 延髄門部、12: 脊髓C7、13: 脊髓L6、14: 小脳皮質、15: 小脳髄質、16: 網膜、17: 下垂体、18: 三叉神経節、19: 脊髓背根神経節、20: 前頸神経節、21: 星状神経節、22: 前腸間膜神経節、23: 視神経、24: 馬尾、25: 顔面神経、26: 舌下神経、27: 迷走神経、28: 交感神経、29: 腕神経、30: 坐骨神経、31: 副腎、32: 回腸、33: 盲腸

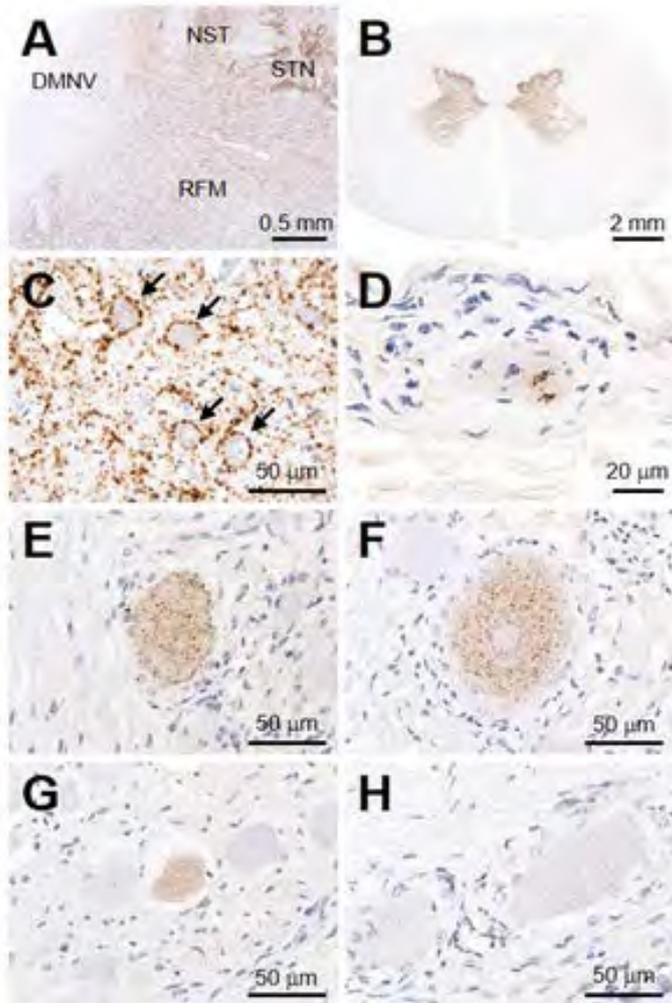


図8 L型BSE感染脳乳剤50g経口接種牛（88 mpi）でのPrPSc蓄積

A：延髄、B：脊髄、C：中脳動眼神経核、D：眼筋、E：三叉神経節、F：脊髄背根神経節、G：前頸神経節、H：中頸神経節

平成29年度

発症した牛から調整したプリオン（6781）は牛型プリオン過発現（TgBoPrP）マウスに生存期間 198.1 ± 11.5 日で伝達し、BSE/JP24をTgBoPrPマウスに接種した 197.4 ± 3.4 日と有意鎖はなく、またプリオンの病理学的ならびに生化学的性状は類似し、発症牛のプリオンの性状はL型BSEと一致した（図9）。生存するL型BSE接種牛1頭（50g；106 mpi）とH型BSE接種牛3頭（50g；89 mpi）に臨床的变化は確認されない。

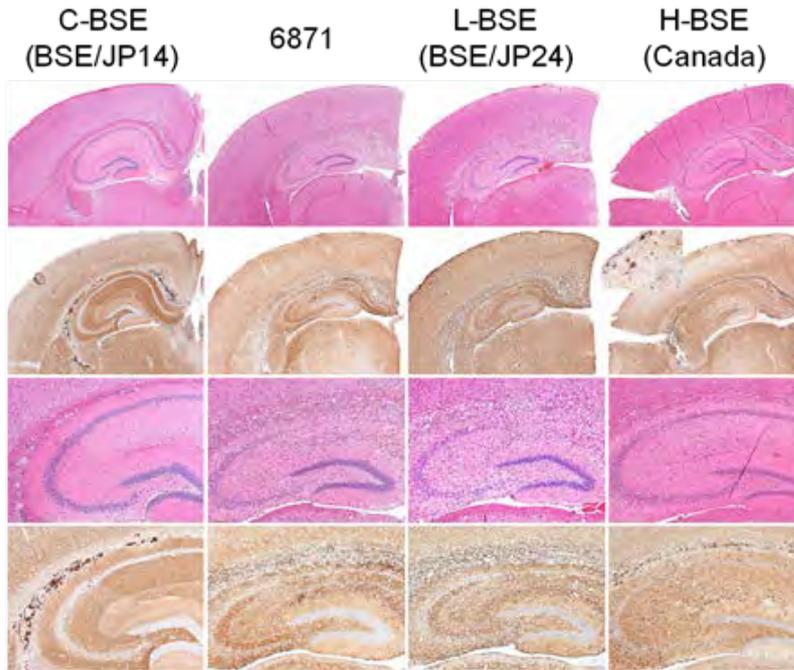


図9 BSEプリオンを接種したTgBoPrPマウスでの病理学的特徴

C-BSE : 定型BSE (国内14例目)、6871 : L-BSE経口感染牛、L-BSE : L型非定型BSE (国内24例目)、H-BSE : H型非定型BSE (カナダ例)

実施課題 (3) 非定型 BSE プリオンの伝達性に基づく性状解析

・非定型 BSE の性状解析

ウシ PrP 過発現マウス (TgBoPrP) を用いて C-、L-および H-BSE の性状を調べ、それぞれが異なる生化学および生物学的性状を示すことを明らかにした (図1および2)。加えて、H-BSE の連続継代の結果、既知の BSE とは全く性状の異なる新たな BSE 株 (BSE-SW) を得た。この BSE-SW は、C-BSE によく似た分子量の PrPres #1 を持つが (図1 B)、野生型マウスへの異種間伝達能は C-BSE とは全く異なることを明らかにした (図3)。

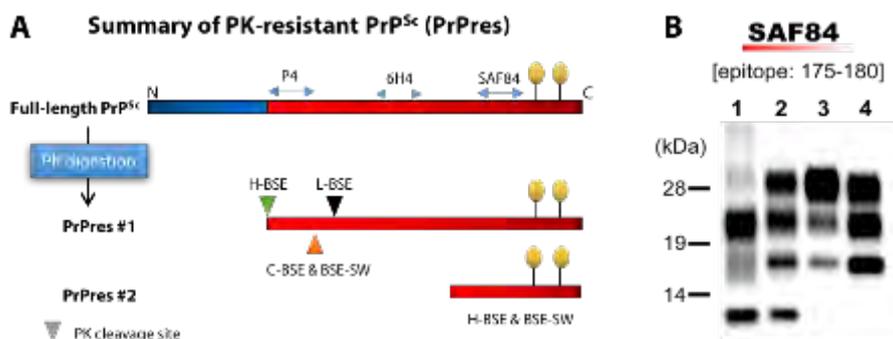


図1 定型および非定型BSEのPrPres

P4、6H4およびSAF84はモノクローナル抗体のエピトープを表す。プロテナーゼK (PK) 消化後のPrPSc断片を PrPres #1および#2とする (図1A)。1 : H-BSE、2 : BSE-SW、3 : C-BSE、4 : L-BSE (図1 B)。

	L-BSE	C-BSE	H-BSE	BSE-SW
Incubation periods	145 ± 3.6	197 ± 10.1	216 ± 5.0	97 ± 3.7
Lesion profile				
PET blot				
PrPres #1	L-BSE type	C-BSE type	H-BSE type	C-BSE like type
PrPres #2	-	-	+	+
Clinical signs	Kyphosis Circling behavior	Tremble	Constant chewing	Emaciation

図2 新たに出現したBSE-SWを含む4つのBSE株の性状比較



図3 BSE-SWとC-BSEの異種間伝播能の比較

C57BL6マウスへのC-BSE、H-BSEおよびBSE-SWの伝播試験結果を表す。i. c. および i. p. はそれぞれ脳内接種、腹腔内接種を示す。

・非定型BSEの異種間伝達リスクの解析

H-BSEは、PrP_{ARQ} (ARQはコドン136、154、171のアミノ酸を表す) を過剰発現するTg0vPrP59マウスには伝達しなかった。一方、C-およびL-BSEは伝達可能であったが、その伝達率は約33%と低く、ウシからヒツジへの異種間伝達は起こりにくいことが示唆された。また、非常に稀な従来型スクレイピーであるCH1641型スクレイピーとL-BSEのPrPresの分子量はほぼ同じであったが(図4A)、脳におけるPrP^{Sc}沈着や空胞化の度合いに違いが認められた(図4B-D)。CH1641型スクレイピーとL-BSEの関連を詳細に調べるため、CH1641型スクレイピーを接種したTgBoPrPマウスの生化学的または生物学的性状をL-BSEを接種したマウスと比較した結果、両者の生物学的性状には明確な違いが認められた(図5)。以上の結果から、Tg0vPrP59やTgBoPrP

マウスへの接種試験が、ヒツジにおけるBSE感染とスクレイピー感染を識別する有効な手段となり得ることを示した。

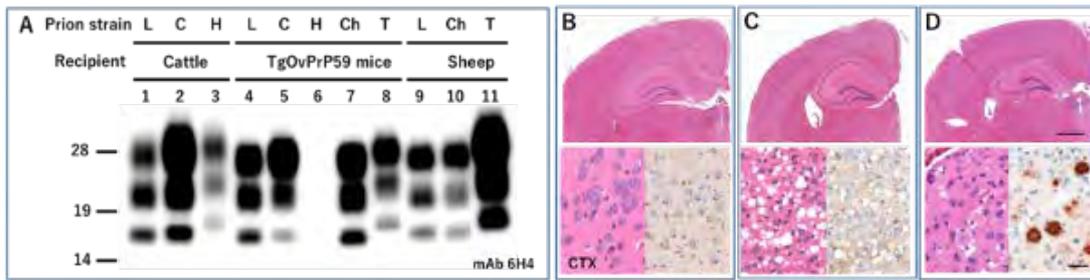


図4 C、L-BSEおよびCH1641型スクレイピー感染TgOvPrP59マウスの性状比較
PrPresバンドパターンを示す(A)。L:L-BSE、C:C-BSE、H:H-BSE、Ch: CH1641-like scrapie、T: Typical scrapie (A)。感染マウス脳の病理像を示す(B-D)。CH1641-like scrapie (B)、L-BSE (C)、C-BSE (D)。CTXは大脳皮質を表す。Bar: 0.05mm (上段) および25 μ m (下段)。HE染色と異常型PrPの免疫染色を示す。

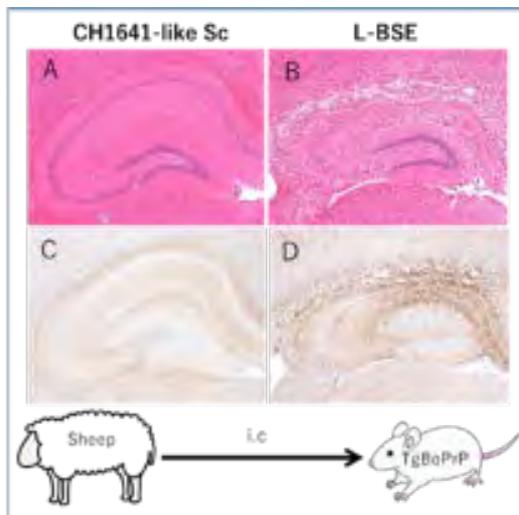


図5 CH1641型スクレイピー感染TgBoPrPマウスの病理像
CH1641型スクレイピー感染 (AとC) およびL-BSE感染 (BとD) を示す。HE染色 (AとB) および衣装方PrPの免疫染色 (CとD) を示す。

L-BSEはウシから野生型マウスに直接伝達しないが、ヒツジで増幅したL-BSEは野生型マウスに伝達可能であり(図6)、野生型マウスで増幅したヒツジ由来のL-BSEを脳内接種したTgBoPrPマウスは、典型的なL-BSEの病態を形成した。以上の結果から、L-BSEはヒツジへ異種間伝達により、その伝達宿主域を変化させることを明らかにした。

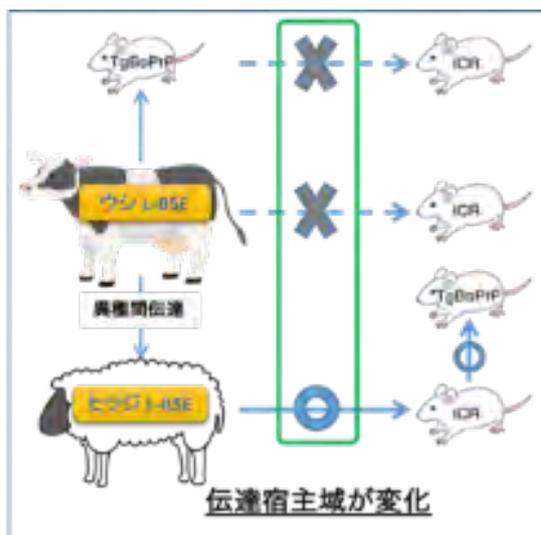


図6 異種間伝播によるL-BSEの宿主域の変化

ウシL-BSEとは異なり、ヒツジで増幅したL-BSEは野生型マウス(ICR)に伝達できる。ICRで増幅したヒツジ由来のL-BSEはTgBoPrPマウスにも伝達し、L-BSEの病態を形成する。

・ウシPrPノックインマウスからの神経幹細胞の分離とBSE感染試験

ウシPrPノックインマウスおよびマウスPrPノックアウトマウスから神経幹細胞を分離した。その神経幹細胞をPrP^Cを発現するアストロサイト様細胞に分化誘導後、C-BSE感染ウシ脳乳剤を添加し、2ヶ月間培養した。その結果、細胞内へのPrP^{Sc}の取り込みは確認されたが、PrP^{Sc}の複製は確認できなかった(図7)。

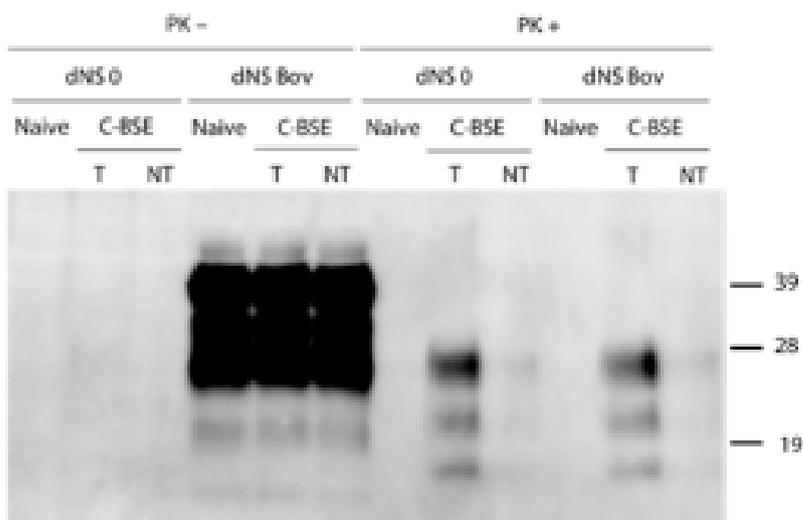


図7 培養細胞へのBSE感染試験結果

dNS 0 : マウスPrPノックアウトマウス由来の神経幹細胞、dNS Bov : ウシPrPノックインマウス由来の神経幹細胞、Naive : 脳乳剤非添加区、T : 試薬X添加区、NT : 試薬X非添加区を表す。C-BSE感染脳乳剤添加実験区でPrP^{Sc}の細胞内への取り込みは観察されたが、複製は認められなかった。

実施課題 (4)

非定型プリオン病のサーベイランスとそのリスク評価

平成 25 年度

CWD サーベイランス体制構築するため、CWD 検出法の確立を行った。米国から輸入した CWD 感染シカ脳乳剤を用いて BSE の確定検査と同様の方法で WB を行い、CWD プリオンを検出可能であることを示した。本年度は 415 検体について非定型スクレイピーサーベイランスを行い、すべて陰性であった。

平成 26 年度

非定型 BSE (H 型 BSE、L 型 BSE) および CWD のヒツジに対する感染リスクを推定するため、PMCA 法を用いて非定型 BSE および CWD プリオンがヒツジ PrP を PK 抵抗性に構造変換するかどうかを調べたところ、H 型 BSE はヒツジ PrP を PK 抵抗性構造に変換することが示された。これまでにヒツジ PrP 発現マウスに対する H 型 BSE の感染性は認められていない。そこで、H 型 BSE をシードにして生成した PK 抵抗性 PMCA 産物をヒツジ PrP 発現マウスに接種した。本年度は 418 検体について非定型スクレイピーサーベイランスを行い、すべて陰性であった。

平成 27 年度

ニッピブル BSE 検査キットを改良することで非定型スクレイピープリオンを高感度検出できる ELISA 系を構築した。本年度は 388 検体について非定型スクレイピーサーベイランスを行い、すべて陰性であった。

平成 28 年度

昨年度構築した非定型スクレイピー高感度検出 ELISA 系では検出できないヒツジプリオン蛋白質の遺伝子型があることが判明したため、ウエスタンブロット (WB) 法による非定型スクレイピーの検出条件を最適化し、ELISA と同等の感度ですべての遺伝子型の非定型スクレイピーを検出できる WB を確立した (図 1)。以後非定型スクレイピーサーベイランスには本 WB 法を用いることにした。TSE サーベイランスの過程 (検査頭数は 493 頭) で本邦初となる非定型スクレイピーを摘発した (図 2)。

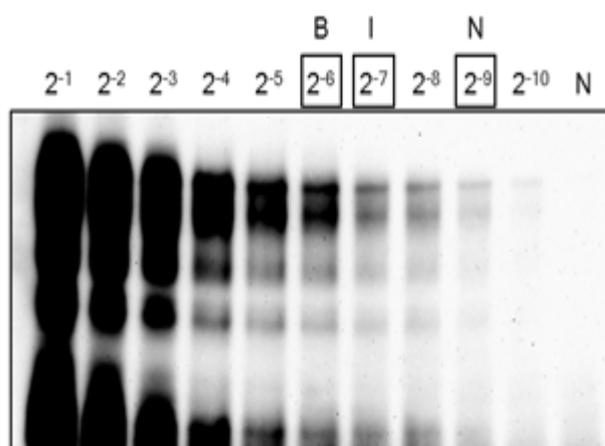


図 1 WB による希釈非定型スクレイピー脳乳剤からの異常プリオン蛋白質検出

非定型スクレイピー脳乳剤を 2 倍階段希釈した後、確立した WB 法で異常プリオン蛋白質を検出した。Bio-Rad ELISA キット (B)、IDEXX ELISA キット (I)、改良ニッピ ELISA キット (N) の検出限界を、脳乳剤希釈倍率に示す。

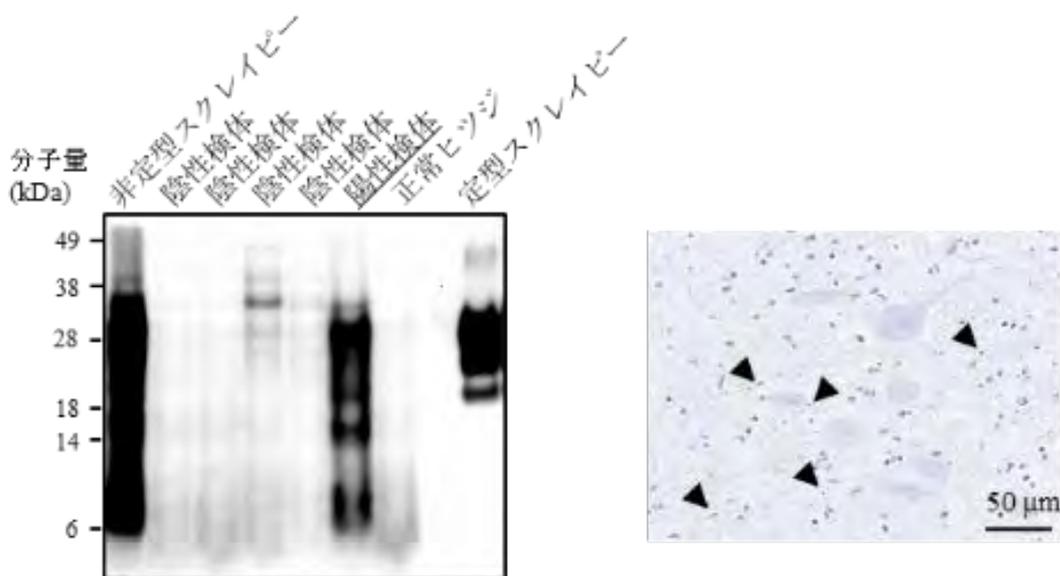


図2 非定型スクレイピー国内初発例の摘発

WB法（左）ならびに免疫組織化学法（右）による異常プリオン蛋白質の検出。下線を引いた検体が非定型スクレイピー国内初発例（ヒツジ）。矢頭は異常プリオン蛋白質の蓄積部位を示す。

平成29年度

平成28年度に整備したWB法を用いたTSEサーベイランスにより、本邦2例目となる非定型スクレイピーを摘発した（図3）。国内2例目の非定型スクレイピーのPK抵抗性異常型プリオン蛋白質の、糖鎖除去後のバンドパターンは類似していた。（図4）。H型BSEシードPMCA産物を接種したヒツジPrP発現マウスにおいてプリオン病の発症と脳におけるPrPScの蓄積が認められた。したがって、H型BSEがヒツジに伝達する可能性が示唆された。CWDサーベイランスの検体の収集体制確立について、千葉県環境生活部自然保護課と兵庫県森林動物センターに協力要請の訪問を行った。その結果、両機関から合計100検体の採材協力を得られることとなり、送付された検体の一部の検査を開始した。

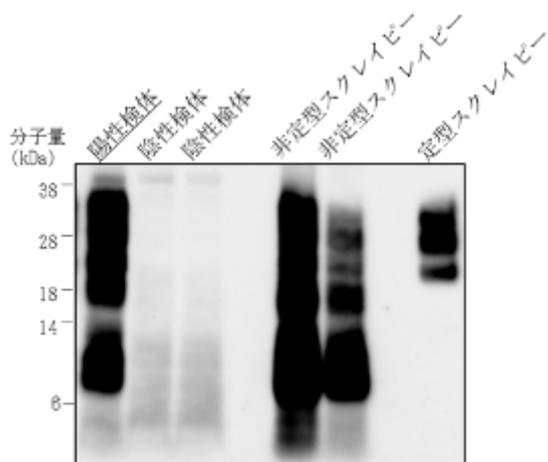


図3 非定型スクレイピー国内2例目の摘発例

WB法による異常プリオン蛋白質の検出。下線を引いた検体が国内2例目の非定型スクレイピー（ヤギ）

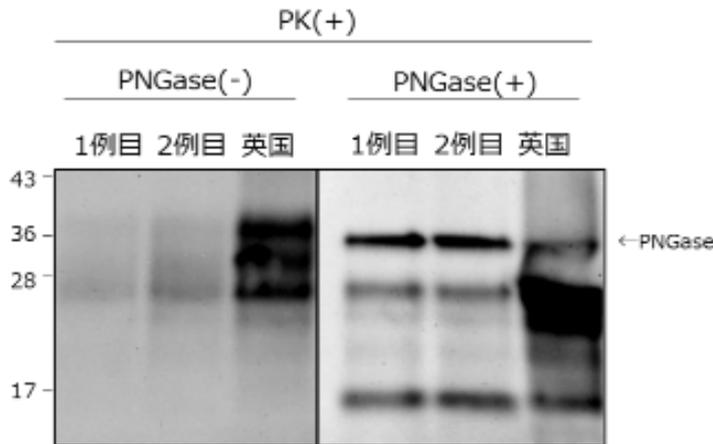


図4 非定型スクレイピー異常型プリオン蛋白質のWB解析

国内で摘発された非定型スクレイピー2例と英国例の、糖鎖除去酵素処理前と (PNGase -) と処理後 (PNGase +) のプロテナーゼK (PK) 抵抗性異常プリオン蛋白質。

3) 成果活用における留意点

非定型BSE感染牛におけるプリオン体内分布が明らかになったが、本研究課題では自然感染ルートでの牛でないため、現場での非定型BSE牛におけるプリオン体内分布とは一致しない可能性がある。また接種試験の結果から、L型非定型BSEは従来型BSEに比べて牛への感染リスクは低いと考えられる。これらの結果は動物性タンパク質の飼料規制などのBSE管理措置やリスク評価を議論する際に有用な知見になると考えられる。残るL型非定型BSE感染脳50gを経口接種している牛1頭については経過観察中である。

ウシでのH-BSEの連続継代によって新たなBSEが出現する可能性が示唆されるため、飼料規制の継続と老齢ウシの監視は重要である。また、種の壁を越えてヒツジに伝達したL-BSEは、ウシL-BSEとは伝達宿主域が異なることに留意する必要がある。本研究の成果は、ヒツジまたはウシプリオンタンパク質遺伝子過発現マウスへの接種試験が、ヒツジにおけるBSE感染とスクレイピー感染を識別する有効な手段となり得ることを示すものであった。

スクレイピーについては、平成29年12月までにヒツジ・ヤギ2373検体についてサーベイランスを行い、平成28年に本邦初となるヒツジ非定型スクレイピー、平成29年にヤギ非定型スクレイピーを摘発した。得られた初発例患者のプリオン蛋白質遺伝子塩基配列を、ヒツジの野生型塩基配列 (GeneBank# AJ567984) と比較した結果、塩基配列に変異 (421番目Tホモ) があつた。推定されるアミノ酸配列を比較すると、コドン141でのLからFへの変異であつた。患者のプリオン蛋白質のアミノ酸配列は、非定型スクレイピーの検出頻度が高いアミノ酸型であつた。2例目の患者のプリオン蛋白質遺伝子塩基配列をヤギの野生型塩基配列 (GeneBank# S82626) と比較した結果、塩基配列に2つの変異 (414番目Cホモと461番目G/Aヘテロ) があつた。前者はコドン138へのサイレント変異であり、後者はコドン154でのRとHの変異であつた。こちらも非定型スクレイピーの検出頻度が高いアミノ酸型であつた。

4) 今後の課題

非定型BSE PrP^{Sc}を高感度に検出する技術を生前診断や畜産物・畜産副産物の安全性評価に応用するためには、自然感染ルートでの感染牛におけるプリオン体内分布を解析し、プリオン不活化技術を評価するとともに、非侵襲性材料 (唾液) を用いた発症前診断法を確立する

必要である。

生存するL型BSE接種牛（50g、1頭；106か月経過）とH型BSE接種牛（50g、3頭；89 か月経過）での伝達の有無を引継ぎ検証する。

ウシPrPノックインマウスの神経幹細胞を用いた新たな培養細胞モデルを作製したが、BSE持続感染モデルの確立には至っていないため、培養条件の再検討や新たなウシPrP発現細胞株の樹立等の対策が必要である。

CWDサーベイランス拡充のため、検体の収集に協力して頂ける機関を増やしていくことが必要と考えられる。

これまでの研究実施期間における研究成果(論文発表、特許他)【一般公表可】

課題番号 13406421

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13406421	1	36	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	動物衛生研究部門	Evaluation of avian paramyxovirus serotypes 2 to 10 as vaccine vectors in chickens previously immunized against Newcastle disease virus	Tsunekuni Rら	Vet Immunol Immunopathol	160(3-4)	184-191	2014	8
2	①	理化学研究所	Comparative analysis of seven viral nuclear export signals (NESs) reveals the crucial role of nuclear export mediated by the third NES consensus sequence of nucleoprotein (NP) in influenza A virus replication	Chutiwitoonchai Nら	PloS One	9(8)	e105081	2014	8
3	①	動物衛生研究部門	Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens	Suzuki Yら	J Virol	88(19)	11130-11139	2014	10
4	①	動物衛生研究部門	Susceptibility of GT1-7 cells to mouse-passaged field scrapie isolates with a long incubation	Miyazawa Kら	Prion	8(4)	306-313	2014	11
5	①	動物衛生研究部門	Dose-dependent responses of pigs infected with foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 by the intranasal and intraoral routes	Fukai Kら	Arch Virol	160(1)	129-139	2015	1
6	①	動物衛生研究部門	Infectivity-associated PrP(Sc) and disease duration-associated PrP(Sc) of mouse BSE prions	Miyazawa Kら	Prion	9(5)	394-403	2015	1
7	①	動物衛生研究部門	Comparative performance of fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 and fetal porcine kidney cell line LFBK- α v β 6 for Foot-and-mouth disease virus isolation	Fukai Kら	J Vet Diagn Invest	27(4)	516-521	2015	7
8	①	動物衛生研究部門	Characterization of an H5N8 influenza A virus isolated from chickens during an outbreak of severe avian influenza in Japan in April 2014	Kanehira Kら	Arch Virol	160(7)	1629-1643	2015	7
9	①	動物衛生研究部門	Acquired transmissibility of sheep-passaged L-type bovine spongiform encephalopathy prion to wild-type mice	Okada Hら	Vet Res	46(1)	81	2015	7
10	①	動物衛生研究部門	A Novel Antiviral Target Structure Involved in the RNA Binding, Dimerization, and Nuclear Export Functions of the Influenza A Virus Nucleoprotein	Kakisaka Mら	PloS Pathog	11(7)	e1005062	2015	7
11	①	動物衛生研究部門	Transmissibility of H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy to Hamster PrP Transgenic Mice	Okada Hら	PloS One	10(10)	e0138977	2015	10

12	①	動物衛生研究部門	Intracontinental and intercontinental dissemination of Asian H5 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in the winter of 2014–2015	Saito Tら	Rev Med Virol	25(6)	388–405	2015	11
13	①	動物衛生研究部門	Proximity of SCG10 and prion protein in membrane rafts	Iwamaruら	J Neurochem	136(6)	1204–1218	2015	12
14	①	動物衛生研究部門	Further evaluation of an ELISA kit for detection of antibodies to a nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus	Fukai Kら	J Vet Med Sci	78(3)	365–373	2016	3
15	①	動物衛生研究部門	Emergence of a novel bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion from an atypical H-type BSE	Masujin Kら	Sci Rep	6(1)	22753–22753	2016	3
16	①	理化学研究所	A high-throughput screening system targeting the nuclear export pathway via the third nuclear export signal of influenza A virus nucleoprotein	Kakisaka Mら	Virus Res	217	23–31	2016	3
17	①	動物衛生研究部門	Pathogenicity of H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from a wild bird fecal specimen and a chicken in Japan in 2014	Tanikawa Tら	Microbiol Immunol	60(4)	243–252	2016	4
18	①	動物衛生研究部門	Transmission of an H5N8–Subtype Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from Infected Hens to Laid Eggs	Uchida Yら	Avian Dis	60(2)	450–453	2016	6
19	①	動物衛生研究部門	Construction and characterization of a full-length infectious cDNA clone of foot-and-mouth disease virus strain O/JPN/2010 isolated in Japan in 2010	Nishi Tら	Res Vet Sci	106(1)	165–169	2016	6
20	②	理化学研究所	インフルエンザウイルス核タンパク質(NP)を標的とした創薬開発	間	臨床免疫・アレルギー科	65(6)	583–587	2016	6
21	①	理化学研究所	Intrinsically disordered region of influenza A NP regulates viral genome packaging via interactions with viral RNA and host PI(4,5)P2	Kakisaka Mら	Virology	496	116–126	2016	6
22	①	北海道大学大学院	Cytokine responses to eye spray adjuvants for enhancing vaccine-induced immunity in chickens	Takaki Hら	Microbiol Immunol	60(7)	511–515	2016	7
23	①	動物衛生研究部門	Coexistence of two forms of disease-associated prion protein in extracerebral tissues of cattle infected with H-type bovine spongiform encephalopathy.	Okada Hら	J Vet Med Sci	78(7)	1189–1193	2016	8
24	①	理化学研究所	NXT1, a Novel Influenza A NP Binding Protein, Promotes the Nuclear Export of NP via a CRM1-Dependent Pathway	Chutiwitoonchai Nら	Viruses	209	v8080209	2016	8
25	①	動物衛生研究部門	Transmission of atypical scrapie to homozygous ARQ sheep.	Okada Hら	J Vet Med Sci	78(10)	1619–1624	2016	10
26	①	動物衛生研究部門	Identification of the first case of atypical scrapie in Japan.	Imamura Mら	J Vet Med Sci	78(12)	1915–1919	2016	12
27	①	動物衛生研究部門	Experimental infections using the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 in animals administered a vaccine preserved for emergency use in Japan	Fukai Kら	J Vet Med Sci	79(1)	128–136	2017	1
28	①	動物衛生研究部門	Susceptibility of chickens, quail, and pigeons to an H7N9 human influenza virus and subsequent egg-passaged strains	Uchida Yら	Arch Virol	162(1)	103–116	2017	1
29	①	動物衛生研究部門	Genome variability of foot-and-mouth disease virus during the short period of the 2010 epidemic in Japan	Nishi Tら	Vet Microbiol	199(1)	62–67	2017	2

30	①	動物衛生研究部門	Oral Transmission of L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy Agent among Cattle.	Okada Hら	Emerg Infect Dis	23(2)	284-287	2017	2
31	①	北海道大学大学院	Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A(H5N6), Japan, November 2016.	Okamatsu Mら	Emerg Infect Dis	23(4)	691-695	2017	4
32	①	理化学研究所	Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of influenza A nucleoprotein and nuclear export protein as a novel target for antiviral drug development	Chutiwitoonchai Nら	Virology	507	32-39	2017	7
33	①	動物衛生研究部門	Recombinant Avian Paramyxovirus Serotypes 2, 6, and 10 as Vaccine Vectors for Highly Pathogenic Avian Influenza in Chickens with Antibodies Against Newcastle Disease Virus.	Tsunekuni Rら	Avian Dis	61(3)	296-306	2017	9
34	①	動物衛生研究部門	Replication of a low-pathogenic avian influenza virus is enhanced by chicken ubiquitin-specific protease 18	Tanikawa Tら	J Gen Virol	98(9)	2235-2247	2017	9
35	①	動物衛生研究部門	Genome Sequence of Foot-and-Mouth Disease Virus of Serotype O Lineage Ind-2001d Isolated from Cattle in Mongolia in 2015	Nishi Tら	Genome Announc	5(45)	e01244	2017	11
36	①	動物衛生研究部門	Five distinct reassortants of H5N6 highly pathogenic avian influenza A viruses affected Japan during the winter of 2016-2017.	Takemae Nら	Virology	512	8-20	2017	12
37	①	動物衛生研究部門	Spatial Transmission of H5N6 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses among Wild Birds in Ibaraki Prefecture, Japan, 2016-2017	Tsunekuni Rら	Arch Virol	163(5)	1195-1207	2018	5

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	21世紀の感染症に挑む	間洋子	理化学研究所	第70回日本細菌学会東北支部総会	2016	8
2	口蹄疫ウイルスO/JPN/2010株実験感染豚の病理学的解析	山田学ら	動物衛生研究部門	第159回日本獣医学会学術集会	2016	9
3	ホルマリン固定パラフィン包埋材料からの口蹄疫ウイルス抗原の免疫組織化学的検出	山田学ら	動物衛生研究部門	第159回日本獣医学会学術集会	2016	9
4	Molecular mechanism of inhibition by a new compound DP2392-E10 against influenza virus replication	Chutiwitoonchai Nら	理化学研究所	第159回日本獣医学会学術集会	2016	9
5	Horizontal transmissibility of the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 among different species of animals	Fukai Kら	動物衛生研究部門	The Open Session of the European Commission for the control of Foot-and-Mouth Disease	2016	10
6	Pathological change of the development of the vesicular lesion in pigs experimentally infected with the foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 strain	Yamadaら	動物衛生研究部門	The Open Session of the European Commission for the control of Foot-and-Mouth Disease	2016	10

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
	該当なし						

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月日
	組み換えパラミクソウイルス	常國良太、西藤岳彦	常國良太、西藤岳彦	動物衛生研究部門		192725	2017年10月	出願中

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	該当なし								

(6) 報道等

区分：①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
	該当なし						

(7) 普及に移しうる成果

区分：①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)	主な利用場面	普及状況
	該当なし				

(8) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日	開催場所	参加者 数	機関名	備考
	該当なし					

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分：①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	②	アグリビジネス創出フェア2017への展示「新規ウイルスベクターを用いた鳥インフルエンザワクチンの開発」	2017	10	4-6	東京ビッグサイト	約38,000人(農水省公表)	農林漁業者や食品企業等の関係者	動物衛生研究部門	