

インフルエンザウイルスの生態解明と ライブラリーの構築

－高病原性鳥インフルエンザの診断と予防への応用－

北海道大学大学院獣医学研究科
動物疾病制御学講座 微生物学教室
(代表：喜田 宏)

1. 研究開発の背景と目的

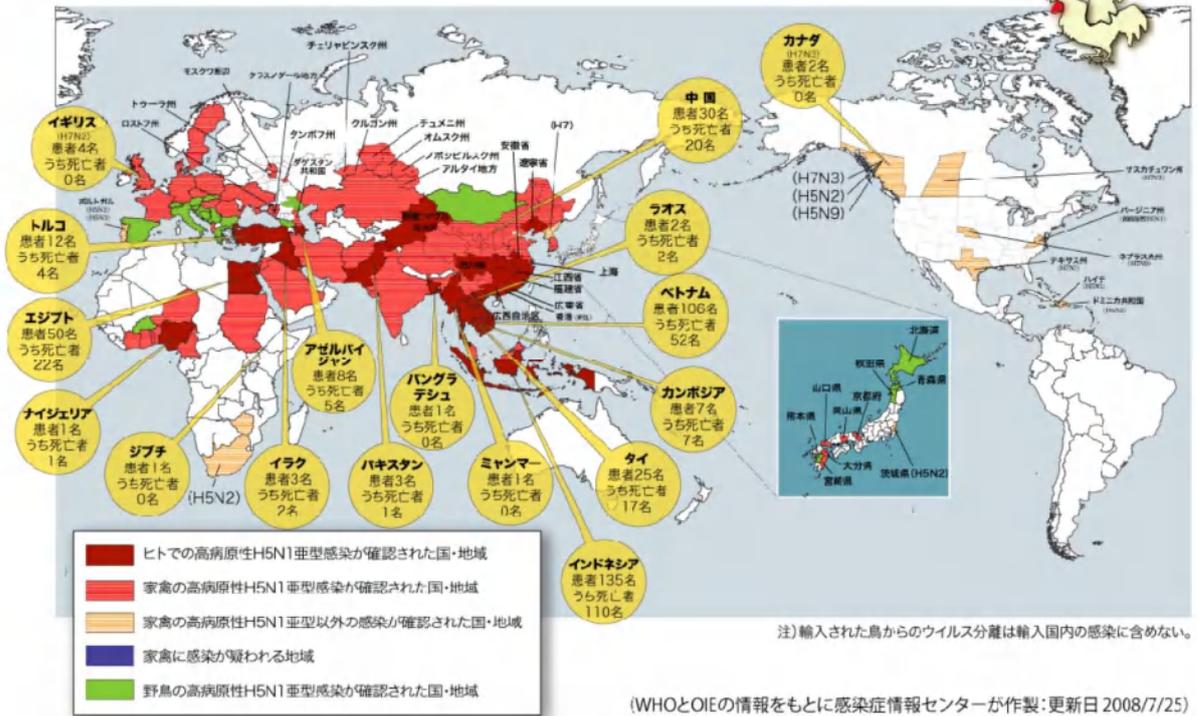
(1) 研究開発の背景と経緯

高病原性鳥インフルエンザは家禽の最重要ウイルス疾病である。感染したニワトリの体内ではウイルスが全身で増殖し、多臓器不全や神経症状を引き起こす。感染鶏は元気消失、食欲減退、肉冠のチアノーゼ、下痢などが顕著に認められる。感染したニワトリの死亡率は高く、治療方法がないことから、ひとたび発生すると養鶏業を中心とした社会経済に甚大な被害を及ぼす。

日本では、1925年、2004年、2005年および2007年に鶏に発生が認められた。さらに2008年春には近隣国の家禽から漏出したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したオオハクチョウが東北、北海道で見つかっている。この高病原性鳥インフルエンザは、アジア、中近東、ヨーロッパ及びアフリカの62カ国に拡がり、2003年末から現在まで、斃死または防疫のために処分された家禽は4億羽を超える。そのうち15カ国では、計387名のヒトが本ウイルスに感染し、245名が死亡していることから、ヒトに大流行を起こす可能性が危惧されている(図1)。

このため、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室では、国内における高病原性鳥インフルエンザの発生を防止するとともに、発生国における蔓延防止を図ることが、畜産物の安定供給とヒトへの感染防止のために必須の課題であることから、インフルエンザウイルスの自然界における生態究明、動物とヒトのインフルエンザの診断・予防に有用なウイルスライブラリーの構築等の研究に取り組んできた。

図1 鳥インフルエンザの公式発表にもとづく分布（2003年10月以降）



(2) 研究開発の概要と成果

高病原性鳥インフルエンザの発生とヒトへの感染を防ぐためには、①野鳥から家禽にウイルスを持ち込ませない、②家禽の中での蔓延を防ぐ、③ヒトへの感染を防ぐの3つが重要である（図2）。

そのためには、まずインフルエンザウイルスの生態、自然宿主と伝播経路を解明することが必要である。さらにその成果を基盤として野外ウイルスの収集とその性状解析を進め、高病原性鳥インフルエンザの診断と予防技術の開発に利用すること、また、これらの新しい技術を普及し、国内外の高病原性鳥インフルエンザ対策に役立てることが重要であることから、当研究室では以下のような研究開発を行った。

図2 鳥インフルエンザと闘う!!



① インフルエンザウイルスの自然界における生態究明

インフルエンザウイルスには表面に存在するヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) が存在する (図 3)。現在までに、HA は H1~H16 まで、NA は N1~N9 まで報告されている。このうち、ニワトリから分離される亜型は一部に限られており、上記の全ての亜型のウイルスは野生水禽、特にカモから分離されている。つまり、ヒト、家畜、家禽のインフルエンザ A ウイルスの起源はすべてカモのウイルスに起因することがわかった。このことは、インフルエンザウイルスの自然界における生態研究が、ヒトと動物全てのインフルエンザウイルスを知るために重要であることを示している。

カモの腸管で増殖し、排泄されるインフルエンザウイルスは、一般にヒトにも動物にも毒力のない非病原性のウイルスである。このウイルスがアヒル、シチメンチョウ、ウズラなどに伝播し、いわゆる家禽で増殖可能なウイルスに変わる。このウイルスがニワトリへと伝播し、そこで受け継がれる間に強い毒力を獲得し、高病原性鳥インフルエンザウイルスが出現することが明らかとなった (図 4)。つまり、高病原性鳥インフルエンザウイルスも、元をたどれば野生水禽の持っている非病原性ウイルスに起因するのである。

図3 インフルエンザAウイルスの電子顕微鏡像

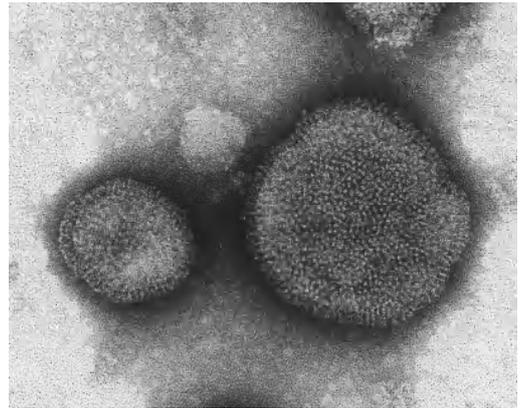
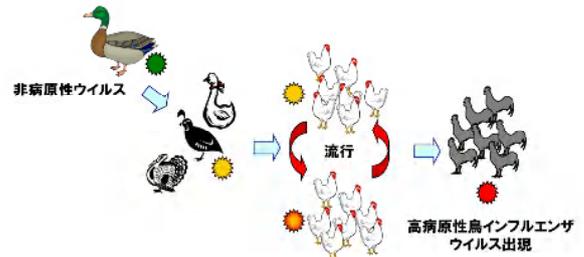


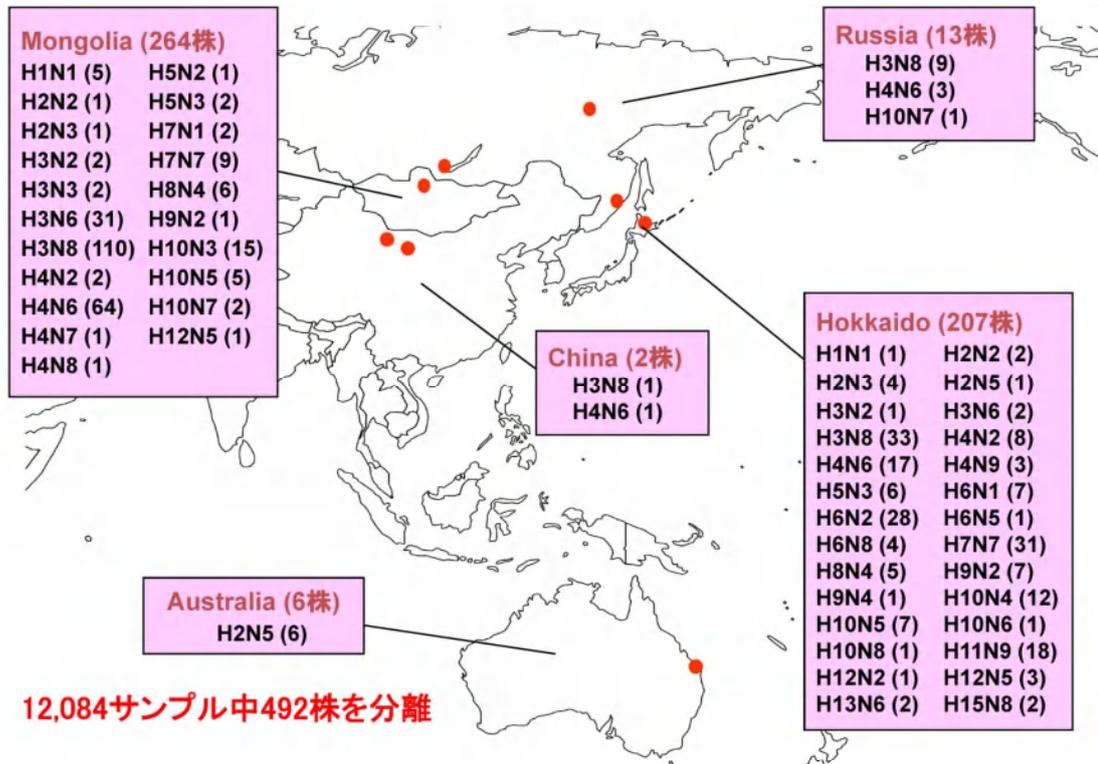
図 4 高病原性鳥インフルエンザウイルス出現のメカニズム



② 鳥インフルエンザの疫学調査 (グローバルサーベイランス)

インフルエンザウイルスの自然界における生態究明を基に、グローバルサーベイランスを実施した。すなわち、野生水禽の営巣地であるシベリア、また渡りの飛翔路にあたるモンゴル、中国、オーストラリア、日本において野生水禽の糞便を採取し、発育鶏卵に接種することにより鳥インフルエンザウイルスを分離した。分離した鳥インフルエンザウイルスは、その遺伝子配列を明らかにし、HA と NA の亜型を決定した (図 5)。さらに、ニワトリに対する病原性を感染実験により明らかにし、これらのウイルス株の性状を関係機関に発信した。野生水禽から高病原性鳥インフルエンザウイルスが容易に分離できるような状況でないという我々の成績は、高病原性株はあくまでも家禽の間で増幅されたウイルスが環境中に漏れ出ただけであり、自然宿主である野生水禽類に定着したウイルスではないことを示している。

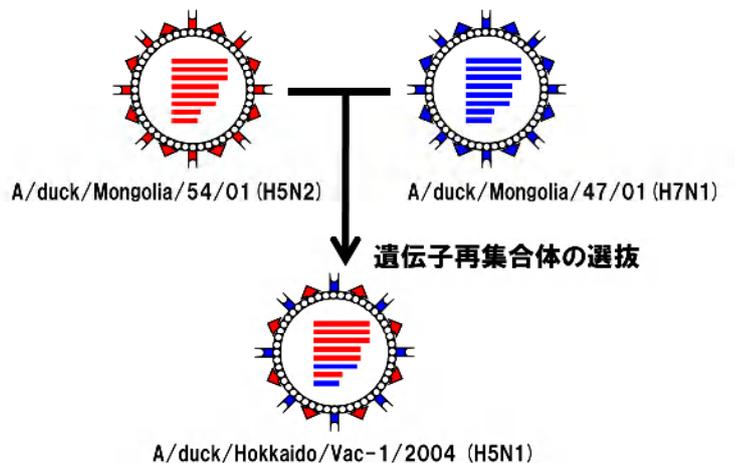
図 5 鳥インフルエンザのグローバルサーベイランス (1999~2006)



③ 動物とヒトのインフルエンザの診断・予防に有用なウイルスライブラリーの構築
 グローバルサーベイランスにおいて分離されたインフルエンザウイルスと実験室内で作出した遺伝子再集合ウイルス (図 6) を合わせて 1,000 株以上を系統保存し、その情報をデータベース化した (図 7)。なお遺伝子再集合ウイルスは、亜型の異なる 2 つのウイルスを発育鶏卵に同時接種し、ブラックローニングにて作出した。

本データベースの情報は、ワクチンや診断に有用なウイルス株を全世界に提供するために利用されており、国際獣疫事務局 (OIE) と国連食糧農業機関 (FAO) の鳥インフルエンザ対策ネットワーク (OFFLU) と連携し、世界に発信されている。

図 6 実験室内での遺伝子再集合ウイルスの作出

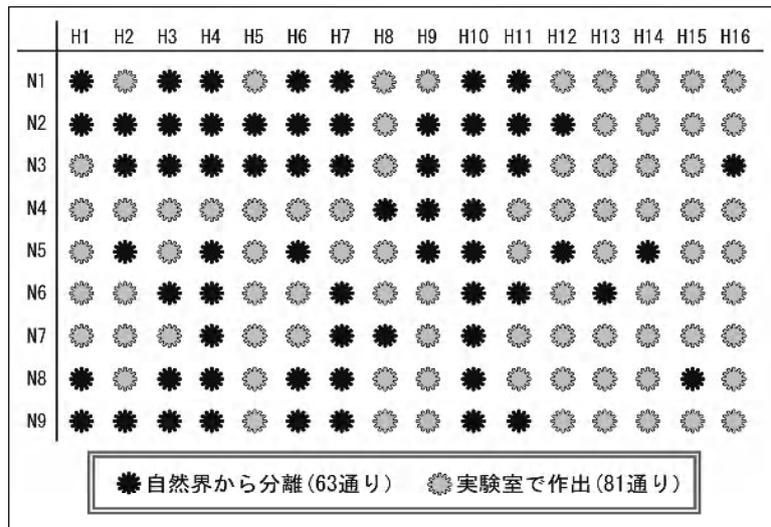


④ 簡易診断キットの開発

確立したインフルエンザウイルスライブラリーを利用して、H5 および H7 亜型特異的簡易診断キットをメーカーと共同開発した。

この診断キットでは、ニワトリからスワブを回収し、その抽出液をキットに滴下し、15分後にインフルエンザウ

図7 インフルエンザウイルスライブラリーの構築



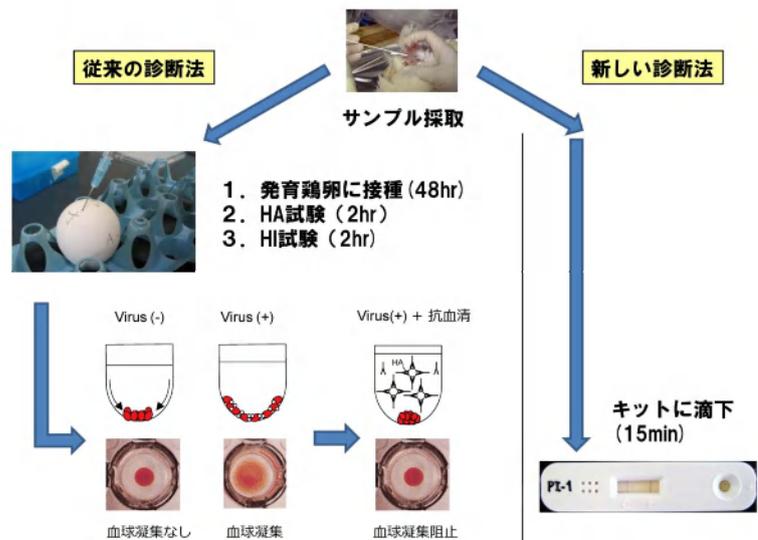
イルス H5 および H7 抗原の検出ができる。従来法ではスワブサンプルを発育鶏卵で 48 時間培養することが必要であったので、今回開発した簡易診断キットは従来法より簡便かつ迅速にウイルス抗原の検出と HA 亜型の同定を行うことが可能となったことがわかる (図 8)。

⑤ H5N1 および H7N7 ウイルスワクチンの開発

ウイルスライブラリーの中から高病原性鳥インフルエンザワクチン製造株として有用なウイルス株を選抜し、国内メーカー4社と H5N1 および H7N7 ウイルスワクチンを共同開発した。

国内で鳥インフルエンザのワクチンは通常使用しないが、蔓延防止を目的として緊急的にワクチン接種が行われることも想定されるので、性能の良いワクチンを準備することは重要である (図 9)。

図8 鳥インフルエンザの新しい診断法の開発



今回開発したワクチンは、HA と NA の亜型が現在流行している H5N1 ウイルスと同一であること、1 回接種で 2 年以上高い抗体が維持されること、接種部位が筋肉なので接種方法が容易であること の利点がある。今後、緊急用ワクチンとして国内で備蓄されることが大いに期待される。

2. 学術的評価ならびに国内外への貢献

(1) 研究開発成果の学術的評価

これまでの研究成果から、家禽、家畜およびヒトのインフルエンザウイルス遺伝子の起源はすべて野生水禽のウイルスにあることをつきとめた。また、インフルエンザウイルスライブラリーを構築し、診断や予防法の開発に利用した。これらの研究成果は、国際的に評価の高い海外学術雑誌に121報発表されているほか、著書、学会発表、新聞発表として公表されている。

また、これらの研究成果は、世界的に広く評価され、現在、当教室は、国際獣疫事務局（OIE）および国際連合食糧農業機関（FAO）、世界保健機構（WHO）のレファレンスラボラトリー、サーベイランス拠点およびヒトと動物間インフルエンザネットワーク拠点としての指定を受け、高病原性鳥インフルエンザ制圧に向けた取り組みを継続し、高病原性鳥インフルエンザの世界的な研究拠点として見るべき成果を収めている。

なお、ヒトの新型インフルエンザ出現に備え、ワクチン候補株の収集を進めると共に、世界保健機構（WHO）、厚生労働省などの行政機関との緊密な連携も高く評価されている。

(2) 国内の養鶏・畜産業への貢献

国内における高病原性鳥インフルエンザの発生を防止することが、畜産物の安定供給とヒトへの感染防止のために必須の課題であることから、H5 および H7 亜型特異的簡易診断キットをメーカーと共同開発したことにより、従来法より簡便かつ迅速なウイルス抗原の検出と HA 亜型の同定を行うことが可能となったことから、より迅速な家畜防疫対応が可能となり、発生の被害を最小限にとどめるこ

図9 高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの開発

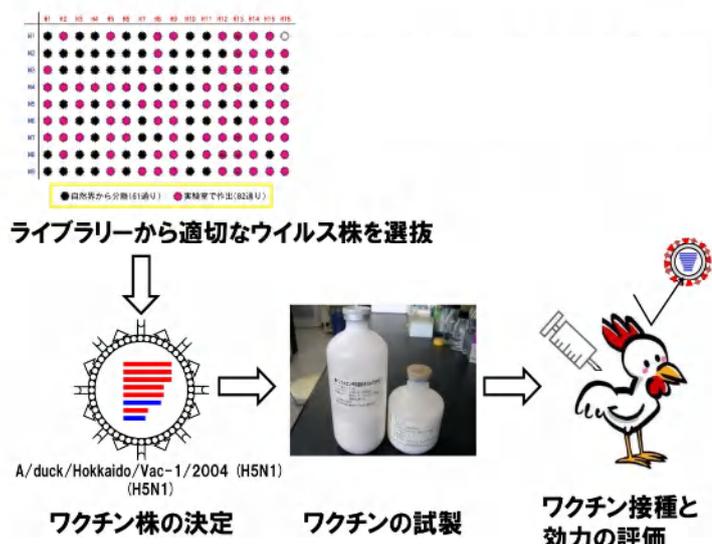


図10 2008年5月サロマ湖で見つかったオオハクチョウの解剖



とに寄与する。また、H5N1 および H7N7 ウイルスワクチンを共同開発したことにより、万が一国内で鳥インフルエンザのワクチンを使用する場合には、国産の有効性の高いワクチンにより養鶏業を守ることが可能となる。

2008 年春、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したオオハクチョウが東北、北海道で見つかった際には、環境省と北海道に診断を依頼され、北海道で発見された 2 羽のオオハクチョウからウイルスを分離した（図 10）。これらのウイルスの遺伝子と病原性を解析し、得られた結果を関係機関に報告するとともに、公的な遺伝子データベースと当該研究室のインフルエンザウイルスデータベースに情報を公開した。今後とも、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染が疑われる事例について、迅速な診断を継続していく予定である。

（3）海外の養鶏・畜産業に対する貢献

OIE の高病原性鳥インフルエンザレファレンスラボラトリーに指定されている当研究室では、アジア各国の高病原性鳥インフルエンザが疑われる検体を受け入れ、診断している。これまでにモンゴル、ラオスなどから受け入れた検体について、迅速に診断し、当該国と OIE に報告してきた。

また、当研究室はこれまでに 2004、2006、2007 および 2008 年に、鳥インフルエンザの診断トレーニングコースを提供している（図 11）。本コースは、アジア各国の鳥インフルエンザの診断技術向上を目的としているものであり、発生・流行に即応するための技術指導を行っている。これらのトレーニングコースを通して鳥インフルエンザの診断に携わる技術者を養成し、各国の防疫対策に多大な貢献をしている。

図 11 鳥インフルエンザ診断トレーニングコースの実施



添付資料

1 論文発表 (抜粋)

- (1) Kida, H., Kawaoka, Y., Neave, C. W. and Webster, R. G. (1987): Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks. *Virology* 159, 109-119.
- (2) Kida, H., Shortridge, K. F. and Webster, R. G. (1988): Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162, 160-166.
- (3) Yasuda, J., Shortridge, K. F., Shimizu, Y. and Kida H. (1991): Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged. *J. Gen. Virol.* 72, 2007-2010
- (4) Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A., Webster, R. G. and Kida, H. (1995): Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.* 140, 1163-1172.
- (5) Okazaki, K., Takada, A., Ito, T., Imai, M., Takakuwa, H., Hatta, M., Ozaki, H., Tanizaki, T., Nagano, T., Ninomiya, A., Demenev, V. A., Tyaptirganov, M. M., Karatayeva, T. D., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., and Kida, H. (2000): Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch. Virol.* 145, 885-893.
- (6) Tsuda, Y., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., and Kida H. (2007): Development of an Immunochromatographic Kit for Rapid Diagnosis of H5 Avian Influenza Virus Infection. *Microbiol. Immunol.* 51, 903-907.
- (7) Manzoor, R., Sakoda, Y., Mweene, A., Tsuda, Y., Kishida, N., Bai, GR., Kameyama, K., Isoda, N., Soda, K., Naito, M., Kida, H. (2008): Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes* 37, 144-152.
- (8) Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Soda, K., Sakabe, S., Sakamoto, R., Imamura, T., Sakaguchi, M., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Saijo, K., Sawata, A., Hagiwara, J., Lin, Z., Kida, H. (2008): Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch Virol.* 153, 1685-1692.
- (9) Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., Kida, H. (2008): Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7

highly pathogenic avian influenza. J Vet Med Sci. 70, 557-562.

- (10) Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y., Kida, H. (2008): A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine*. 26, 2127-2134.

2 著書および総説（抜粋）

- (1) 喜田宏（2006）：人獣共通感染症としての高病原性鳥インフルエンザとワクチン. 日医雑誌 134, 1940-1944.
- (2) Kida, H. and Sakoda Y. (2006): Library of influenza virus strains for vaccine and diagnostic use against highly pathogenic avian influenza and human pandemics. *Dev Biol(Basel)* 124: 69-72.
- (3) 喜田宏（2006）：特集インフルエンザの克服に向けて インフルエンザウイルスの生態 *Medical Science Digest* 32, 4-5.
- (4) 喜田宏（2007）：新型インフルエンザの発生の危機をいかに防ぐか 北海道公衆衛生学雑誌 20, 15-23.
- (5) 磯田典和, 喜田 宏（2007）：鳥インフルエンザに対するワクチンの開発 月刊 PHARMSTAGE 7, 84-87.
- (6) 喜田 宏（2007）：鳥とヒトのインフルエンザワクチン株ライブラリー ブレインテク ノニュース 123, 21-25.

3 マスコミに取り上げられた記事（抜粋）

- (1) 「鳥インフルエンザ ニワトリに国産ワクチン」（2006年3月22日 読売新聞）
- (2) 「鳥インフル ワクチン開発に新手法」（2007年5月2日 読売新聞）
- (3) 「新型インフルエンザ対策、北大のデータベースも貢献」（2007年10月28日 北海道新聞）
- (4) 「北海道のオオハクチョウから強毒性の鳥インフルを検出」（2008年5月6日 読売新聞）
- (5) 「鳥インフルエンザウイルス、サロマ湖も強毒性」（2008年5月10日 読売新聞）

4 表彰された賞等（抜粋）

- (1) 喜田宏「新型インフルエンザウイルスの出現機序の解明と対策に関する研究」
（平成14年3月 第42回 北海道科学技術賞）
- (2) 喜田宏「鳥、動物とヒトインフルエンザウイルスの生態学的研究」
（平成16年11月 第58回 北海道新聞文化賞）

- (3) 喜田宏「インフルエンザウイルスの生態に関する研究」
(平成 17 年 4 月 平成 17 年度 日本農学賞・読売農学賞)
- (4) 喜田宏「インフルエンザ制圧のための基礎的研究—家禽、家畜およびヒトの新型インフルエンザウイルスの出現機構の解明と抗体によるウイルス感染性中和の分子的基盤の確立—」
(平成 17 年 6 月 第 95 回 日本学士院賞)
- (5) 迫田義博「高病原性鳥インフルエンザの予防と診断法の開発に関する研究」
(平成 20 年 10 月 第 4 回 若手農林水産研究者表彰)