

ブタからのインフルエンザウイルスの分離 — 第2報 —

Isolation of Influenza Virus in Swine

佐藤 由紀 庄司 美加 後藤 郁男
 佐藤千鶴子*¹ 植木 洋 上村 弘
 沖村 容子 齋藤 紀行*²
 Yuki SATO, Mika SHOJI, Ikuo GOTO
 Chizuko SATO, Yo UEKI, Hiroshi UEMURA
 Yoko OKIMURA, Noriyuki SAITO

厚生労働省は「感染症流行予測調査」の中で、2005年度から新型インフルエンザウイルスの出現監視を目的とした、ブタの鼻腔拭い液からのウイルス分離による感染源調査を開始した。本県も2006年度からこの事業に参加し2年間で200検体について調査を実施した。このうち5検体からインフルエンザウイルス AH3N2 亜型を分離した。併せて各シーズンにブタ飼育施設がある地域のヒトから当センターで分離した AH3N2 亜型ウイルスとの関連性を、血清学的及び分子疫学的に検討、解析した結果、少なくとも2007年度にブタから分離したウイルスに関してはヒトのインフルエンザウイルスに極めて近いことが明らかとなった。

キーワード：インフルエンザウイルス；ブタ；HI；遺伝子解析

Key words : Influenza Virus ; swine ; hemagglutinin inhibition test ; Gene Analysis

1 はじめに

インフルエンザウイルス (A 型) は、ヒトをはじめ水鳥、家禽、ブタなど多くの動物に感染するため、最近では人獣共通感染症として認められつつある。特にブタの呼吸器上皮細胞は、トリ由来及びヒト由来のどちらのウイルスにも結合するレセプターを持っているため、ブタがトリ、ヒト両方のウイルスに同時に感染した場合、ブタの感染細胞内で遺伝子再集合が起こり全く新しいインフルエンザウイルスができる可能性がある。このようなことから、厚生労働省は「感染症流行予測調査事業」¹⁾の中で2005年度から新型ウイルスの出現監視を目的としたブタの鼻腔拭い液からのウイルス分離による感染源調査を開始した。本県もこの事業に2006年度から参加し2年間で200検体について調査を実施した結果、2006年度は3検体、2007年度は2検体からインフルエンザウイルスを分離した。そこでこの5株のウイルス株の関連性を精査し、併せてブタ飼育施設のある地域のヒトから分離したウイルス株との関連性についても検討したので報告する。

2.2 検査方法

ウイルスの分離方法は「感染症流行予測調査事業術式」²⁾に準じた。すなわちMDC K細胞を用いてマイクロプレート法で、細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) の有無にかかわらず2代目まで細胞培養を行い、培養上清について0.5%七面鳥血球で赤血球凝集反応を実施した³⁾。CPEが認められ、赤血球凝集反応陽性を示した検体については、国立感染症研究所から指定された抗血清3種 A/Hiroshima (ヒト) /52/2005 (H3N2), A/swine (ブタ) /Saitama/27/2003 (H1N2), A/duck (アヒル) /Ukraine/1/63 と2006-2007シーズンに配布されたヒト AH1 亜型 A/NewCaledonia/20/99 及び昨シーズン以前のヒト AH3 亜型抗血清4種 A/NewYork/55/2004, A/Wyoming/03/2003, A/Panama/2007/99, A/Sydney/5/97 を用い、赤血球凝集抑制試験 (hemagglutinin inhibition test : HI) を行った。はじめに0.5%七面鳥血球と0.75%モルモット血球でHIを比較したところほぼ同じHI価を示したので、以後ヒト

2 方法

2.1 検体採取時期と件数

対象は県内 A 地域で飼育された6ヶ月齢のブタの鼻腔拭い液で、表1に示したとおり、6月から10月までに毎月1回計5回、1回につき15件から25件、各年100件体ずつ合計200検体について調査した。

表1 検体数

2006年度			2007年度		
検体採取日	検体数		検体採取日	検体数	
7月	10日	25件	6月	29日	20件
7月	24日	15件	7月	26日	20件
8月	7日	20件	8月	6日	20件
9月	11日	20件	9月	30日	19件
10月	2日	20件	10月	1日	21件
合 計	100件		合 計	100件	

* 1 現 拓桃医療療育センター

* 2 現 東北生活文化大学

の抗血清を用いての HI 価は 0.75%モルモット血球を使用して測定した。さらに HA (hemagglutinin) の亜型及び NA (neuraminidase) の亜型については HA⁴⁾ と NA⁵⁾ それぞれをコードするウイルス遺伝子の一部を RT-PCR で増幅し、PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定して確認した。

3 結果および考察

2006 年 9 月に採取した 3 検体と 2007 年 7 月と 9 月に採取したそれぞれ 1 検体に CPE が認められ、この培養上清について赤血球凝集反応で凝集を確認した。この 5 株 (A/swine/Miyagi/1/06, 2/06, 3/06, 1/07, 2/07) について HI 試験を行った結果を表 2 に示した。国立感染症研究所から配布されたブタ (A/swine/Saitama/27/2003 (H1N2)) 及びトリ (A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)) 抗血清に対する HI 価と 2006-2007 シーズンのヒト AH1 亜型に対する HI 価はいずれも 1:10 未満だった。また 2007-2008 シーズンの AH3 亜型とそれ以前に配布されたヒト AH3 亜型 4 種について HI 価を測定した結果、5 株とも 2003 年以前の AH3 亜型に対しては全て 1:10 未満だった。しかし、A/Hiroshima/52/2005 に対しては 1:10 から 1:160、A/NewYork/55/2004 に対しては 1:40 から 1:160 の HI 価を示した (表 2)。このことより、ブタから分離した 5 株の抗原性はヒト由来インフルエンザ株に近く、中でも 2004 年以降に流行した株に近縁であることが推測された。一方、亜型を確認する目的で RT-PCR を行った結果、2007 年度に分離した 2 株も共に H3N2 亜型であることが明らかとなり、この 2 株の HA 領域 354bp の塩基配列の相同性は 100%を示した。また、この 2 株と 2006 年度にブタから分離した 3 株について同様に解析した結果、アミノ酸配列の相同性は 95.8%であった。さらにヒト由来インフルエンザウイルスとの関連性をみるために、ヒト CDC レファレンス株とワクチン株、および 2003 年以降に当センターで分離したブタ飼育施設のある地域とその近隣地域のヒトインフルエンザウイルス株についての AH3 領域アミノ酸残基 114 個の配列を図 1 に示した。当センターで分離したヒトのイ

ンフルエンザウイルスについては、ブタの調査期間に近い時期であるシーズン後半 1 月以降の検体について扱った。ブタからウイルスを分離した 2006 年と 2007 年のアミノ酸配列を比較すると、2006 年のヒトとブタでは 7 から 8 ヶ所のアミノ酸の違いがあり、2006 年と 2007 年のヒト同士では 3 から 4 ヶ所、2006 年と 2007 年のブタ同士では 7 ヶ所、2007 年のヒトとブタでは 1 ヶ所の違いがあった。また 2006 年のヒトと 2007 年のブタの間では 3 ヶ所、2006 年のブタと 2007 年のヒトの間では 7 ヶ所の違いがあった。この HA 領域の一部のアミノ酸配列に基づく系統樹を図 2 に示した。系統解析の結果、2006 年と 2007 年にブタから分離したインフルエンザウイルスは、互いに異なったクラスターを形成していた。ヒトのレファレンス株とワクチン株は 1997 年から経年的に分岐しており、今回我々が分離したヒトインフルエンザウイルスも同じような分岐パターンを確認した。その中に入る形でブタから分離したウイルスがクラスターを形成していた。この結果は、今回 HI 試験において 2004 年以降のヒト型株に抗原性が類似していた結果を分子疫学に支持する結果といえる。また、2007 年度の結果だけを見ると、2007 年はヒトとブタのアミノ酸の配列が 1 ヶ所しか変わらないこと、ヒトの流行が 1 月から 3 月と冬場で、ブタのウイルス分離がその後の 7 月から 9 月と夏場であること、また HI の結果も考え合わせると、先のシーズンのヒトインフルエンザウイルスが何らかの方法でブタに移った可能性も考えられる。しかし、2006 年度と合わせて考えた場合、アミノ酸配列で 7 から 8 ヶ所の違いがあること、またヒトからブタへの感染経路について、あるいはブタの感染メカニズムについてなど、まだ不明点が多い。今後もウイルス株精査と調査を継続し、ブタのウイルス感染を監視していくと共にヒトインフルエンザウイルスとの関連性を検討していく必要がある。

謝 辞

本調査にご協力頂きました食肉衛生検査所、登米家畜保健衛生所、栗原保健所の方々に深謝いたします。

表 2 HI 試験結果

抗血清	検体No.	2006年			2007年	
		A/swin/Miyagi/1/06	A/swin/Miyagi/2/06	A/swin/Miyagi/3/06	A/swin/Miyagi/1/07	A/swin/Miyagi/2/07
A/swine/saitama/27/2003	(H1N2)	<10	<10	<10	<10	<10
A/duck/Ukraine/1/63	(H3N8)	<10	<10	<10	<10	<10
A/NewCaledonia/20/99	(H1N1)	<10	<10	<10	<10	<10
A/Hiroshima/52/2005	(H3N2)	40(1280)	10(1280)	20(1280)	160(1280)	80(1280)
A/NewYork/55/2004	(H3N2)	160(1280)	160(1280)	80(1280)	160(1280)	40(1280)
A/Wyoming/03/2003	(H3N2)	<10	<10	<10	<10	<10
A/Panama/2007/99	(H3N2)	<10	<10	<10	<10	<10
A/Sydney/5/97	(H3N2)	<10	<10	<10	<10	<10

*()内数値はホモ価を表示

参考文献

- 1) 平成19年度感染症流行予測調査実施要領(厚生労働省健康局, 結核感染症課)
- 2) 感染症流行予測調査事業検査術式(平成14年6月)
- 3) 佐藤由紀他:宮城県保健環境センター年報, 25, P117~119

- 4) 高尾信一:広島県保健環境センター研究報告 No.2 p.9 (1994)
- 5) K.E.WRIGHT Journal of Clinical Microbiology May, p.1180 (1995)

A/Cydney/5/97	D Y A S L R S L V A S S G T L E F N N E S F N W T G V A Q N G T S Y A C K R S S I K S F F S R L N W L H Q L K Y K
A/Panama/2007/99 R . N N
A/Fujian/411/02 T S R . N T H
A/Wyoming/3/03 A T S R . N K T H
A/NewYork/55/04 T S S R . N N T H F
A/Hiroshima/52/05 T S R . N N T R F
A/Miyagi/61/03 T S R K T H
A/Miyagi/93/05 T S R . R . N N T H F
A/Miyagi/97/05 I T S R . N Q T H F
A/Miyagi/43/06 T S R . N N T H F
A/Miyagi/45/06 T S R . N N T H F
A/swine/Miyagi/1/06 I T S K . N S T H R F
A/swine/Miyagi/1/07 I T S G . G N T H F
A/Miyagi/20/07 I T S G . D N T H F

A/Cydney/5/97	Y P A L N V T M P N N D K F D K L Y I W G V H H P S T D S D Q T S I Y A Q A S G R V T V S T K R S Q Q T V I P N I
A/Panama/2007/99 E
A/Fujian/411/02 E G I L I
A/Wyoming/3/03 E V I L I
A/NewYork/55/04 E V N I R L I
A/Hiroshima/52/05 E G N I F L I
A/Miyagi/61/03 E G N I L I
A/Miyagi/93/05 E G N I L I
A/Miyagi/97/05 E G N I L P I
A/Miyagi/43/06 K E G N I F L I
A/Miyagi/45/06 E G N I F L I
A/swine/Miyagi/1/06 E E G Y N I I
A/swine/Miyagi/1/07 E G N I F L I
A/Miyagi/20/07 E G N I F L I

図1 HA領域のアミノ酸配列

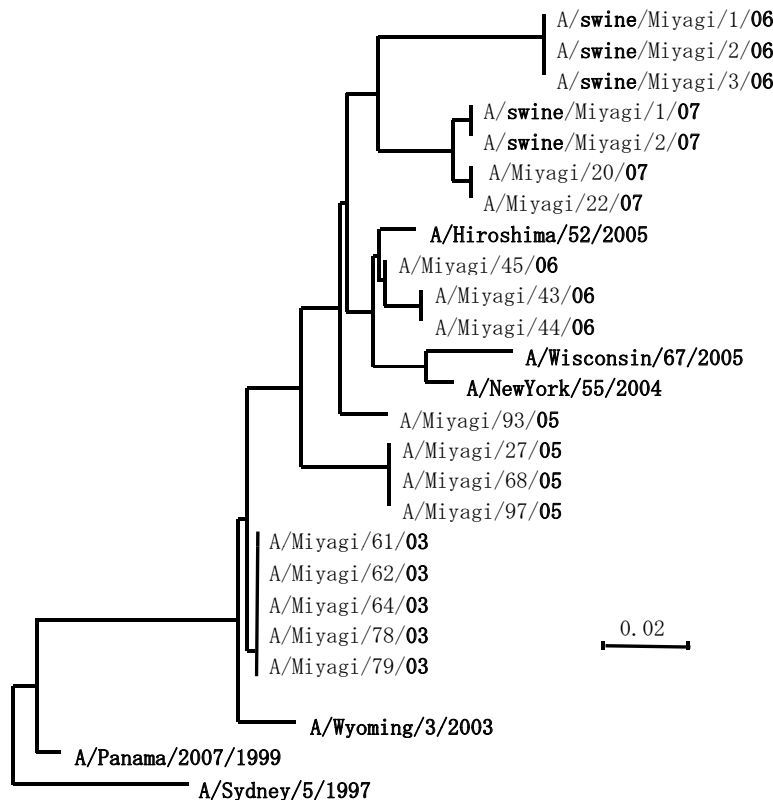


図2 HA領域のアミノ酸配列に基づく系統樹