

資料

独自に進化した多型のブタインフルエンザウイルスが日本で流行している

峯 淳 貴

(国立研究開発法人 農研機構 動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域 新興ウイルスグループ)

Mine J. (2023). Genetic divergence of the Influenza A virus of swine circulating in Japan.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 82, 23-27.

キーワード：ブタインフルエンザ、サーベイランス、
遺伝子解析、豚呼吸器複合病

1. はじめに

ブタインフルエンザはブタの急性呼吸器感染症で、ブタインフルエンザウイルス (IAV-S) が感染したブタでは発熱、せき、くしゃみ、食欲不振などヒトのインフルエンザに似た症状を示し、多くの場合一週間程度で回復する。致死性は低いものの増体率の減少などによる経済的損失を招き、さらに豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスや豚サーコウイルス 2 型、マイコプラズマなど他の呼吸器感染症との重複感染により豚呼吸器複合病を引き起こし、症状を重篤化させる³⁾。

インフルエンザウイルスは動物の細胞表面にあるレセプターを認識する。ヒトにはシアル酸とガラクトースが $\alpha 2, 6$ 結合しているもの (ヒト型レセプター) が、鳥には $\alpha 2, 3$ 結合しているもの (鳥型レセプター) が多く存在している。ヒトのインフルエンザウイルスがヒト型のレセプターを、鳥のインフルエンザウイルスが鳥型のレセプターを認識することが、インフルエンザウイルスの宿主特異性に大きく関与している。ブタの気管上皮細胞には鳥とヒトのインフルエンザウイルスに対するレセプターが両方発現しているために、ブタは両ウイルスに対して感受性を有する²⁾。この性質のため、ブタの中で複数のインフルエンザウイルスが感染した際にその遺伝子が混合 (遺伝子再集合) し、新たな遺伝子組成を持ったウイルスが出現することがある。2009 年にパンデミックを起こした H1N1 亜型インフルエンザウイルスは、ブタ、鳥、ヒトのインフルエンザウイルス由来の遺伝子が混在しており、その出現にブタが重要な役割を担っていたと考えられている¹⁾。

このように、IAV-S は養豚産業への経済被害の原因となることに加え、新たなパンデミックウイルスの出現に重要な役割を持っている。しかしながら、IAV-S

単独感染でのブタの症状は軽度であり、症状を全く示さない (不顕性感染) こともある上に致死率も低いことから、ブタインフルエンザは監視伝染病に指定されていない。そのため、国内でのブタインフルエンザ感染症に関する報告は少なく、近年日本で流行している IAV-S の特徴は明らかになっていない。

農場でブタインフルエンザを制御するための手段の一つにワクチンがある。IAV-S のワクチンは、ウイルスの表面抗原であるヘマグルチニン (HA) タンパク質ならびにノイラミニダーゼ (NA) タンパク質により示される抗原性が流行株と交差している場合に高い感染防御やウイルス排泄抑制能が期待される。しかしながら、国産ワクチンには 40 年以上前に国内で流行していた IAV-S (H1 亜型が 1979 年、H3 亜型が 1969 年分離株) がワクチン株として使用されており、近年に国内で流行している IAV-S と抗原的に一致しているかは不明である。本研究では、2015 年以降我々のグループで行っているブタインフルエンザサーベイランスならびに病性鑑定で得た IAV-S について系統学的な解析を行った結果を示すとともに、既存ワクチンの近年流行株に対する効果について情報を提供する。

2. 調査方法

2015 年以降、ブタインフルエンザサーベイランスならびに病性鑑定業務を通して国内の 21 都道府県の養豚場のブタから臨床症状の有無を問わず無作為に鼻腔拭い液を採取し、リアルタイム PCR 法により A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子を検出した。A 型インフルエンザウイルス陽性と判定された検体については、MDCK 細胞並びに鶏卵によるウイルス分離を試みた。分離されたウイルスの全遺伝子配列を解読し、系統解析を行った。分離された IAV-S の内、H1N1 亜型の IAV-S (A/swine/Gunma/8-2986/2016 : 群馬株) 及び H3N2 亜型の IAV-S (A/swine/Chiba/1-5640/2018

：千葉株）について、ブタインフルエンザワクチン（京都微研、日本）を用いてチャレンジ試験を行った。ワクチンには H1N1 亜型のブタインフルエンザウイルス（A/swine/Kyoto/3/79: 京都株）並びに H3N2 亜型のブタインフルエンザウイルス（A/swine/Wadayama/5/69: 和田山株）が含まれる。それぞれの攻撃株についてワクチン接種群を 4 頭、非接種群を 4 頭使用した。ワクチン接種群は 4 週齢時並びに 7 週齢時に 2 度のワクチン接種を行い、その後両群が 10 週齢時に 1.0×10^4 50% ウイルス感染量（TCID₅₀/mL）のウイルスをネブライザー（オムロン、日本）を用いて吸入させた。ウイルス接種後 1、3、5、7、14 日目に鼻腔拭い液を採取し、ウイルス排泄量を定量するために MDCK 細胞を用いて TCID₅₀/mL を算出した。また、ワクチン接種前、ウイルス接種前、並びにウイルス接種 14 日後に採血し、ELISA（IDEXX、米国）並びに赤血球凝集阻止試験により抗体価を測定した。

3. 結果

2015 年から 2023 年にかけて 1 道 14 県の養豚場から 13,677 検体の鼻腔拭い液を採取し、1 道 10 県で 911 株の IAV-S を分離した。サーベイランスを通じての IAV-S の分離率は 6.7% であり、臨床症状を示すブタだけでなく、無症状のブタからもウイルスが分離された。表面抗原である HA 遺伝子を解析したところ、大きく 3 つの系統（1A.1 Classical swine H1、A (H1N1) pdm09

H1、ヒト季節性 H3）の HA を持つウイルスに分類された（図 1）。1A.1 Classical swine 系統の H1 遺伝子を有する IAV-S は系統的にヒトからブタに種間伝播した 1970 年以降、国内で固有の進化を遂げており、他国の IAV-S の H1 遺伝子とは遺伝的に大きく異なっていた。1990 年代後期にヒトからブタに異種間伝播したとされるヒト季節性インフルエンザウイルス由来の H3N2 亜型 IAV-S は、サーベイランス期間中に日本で分離された全株が遺伝的に近縁であった。2009 年に世界的に流行した A (H1N1) pdm09 ウイルス由来の IAV-S は、系統樹上で一つのグループにまとまらず、散発的に豚群に侵入していることが示唆された。もう一つの表面抗原である NA 遺伝子は、上述の 1A.1 Classical swine 系統の IAV-S が有していた N2 遺伝子、H3N2 亜型の IAV-S が有していた N2 遺伝子ならびに、A (H1N1) pdm09 ウイルスが有していた N1 遺伝子に分類された。全長遺伝子の解析により、A (H1N1) pdm09 ウイルスが侵入した 2009 年以降、このウイルスが日本固有の IAV-S と遺伝子再集合を起こし、表面抗原遺伝子、内部遺伝子共に A (H1N1) pdm09 ウイルスに置き換わっているウイルスが多数存在した。

地理的な分布に注目してみると、1A.1 Classical swine 系統の HA 遺伝子を有する株は関東地方（群馬県、栃木県、千葉県、茨城県）、東北地方（岩手県）、並びに九州地方（宮崎県、鹿児島県）で分離された（図 2）。H3 遺伝子を有する株は九州地方並びに千葉県に限局

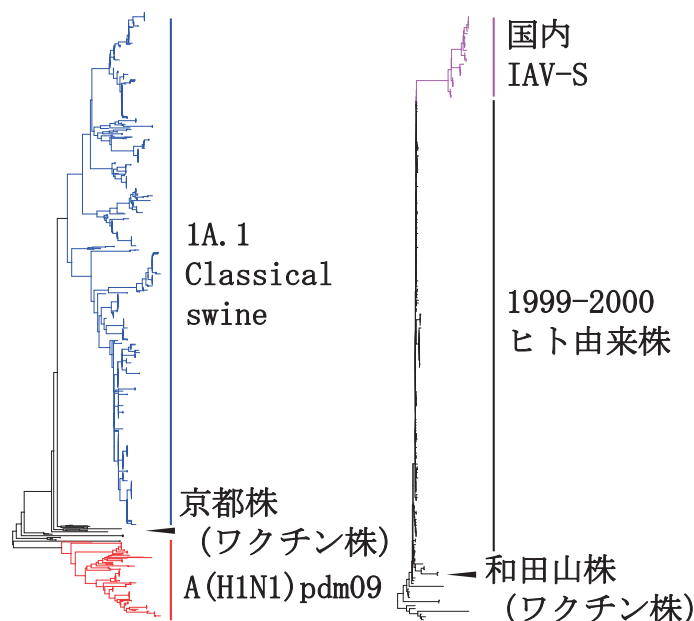


図1 HA遺伝子による日本の
ブタインフルエンザウイルスの分類

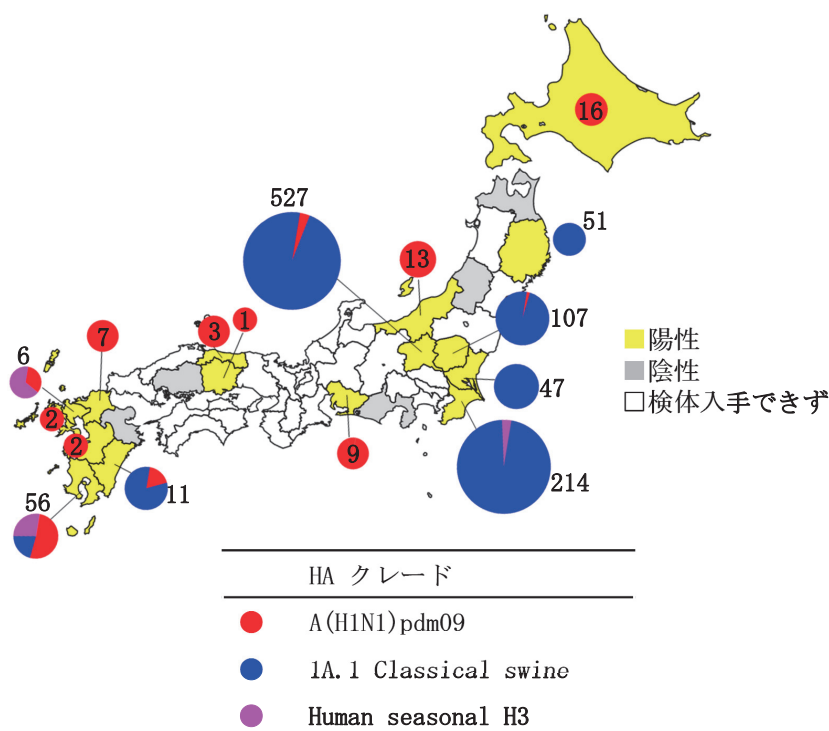


図2 HA遺伝子により分類されたブタインフルエンザウイルスの分布

していた。一方で A (H1N1) pdm09 ウイルスの HA 遺伝子を持つ IAV-S は北海道、本州（新潟県、栃木県、群馬県、愛知県、鳥取県、岡山県）、九州（鹿児島県、宮崎県、長崎県、福岡県、熊本県、佐賀県）に存在していた。

チャレンジ試験に用いた群馬株 [A (H1N1) pdm09 H1] とワクチン株である京都株での HA 遺伝子の塩基相同率は86.5%、千葉株とワクチン株である和田山株での HA 遺伝子の塩基相同率は85.7%であった。ワクチン接種群と非接種群との間でのピーク時のウイルス

排泄量についてスチューデントの t 検定を行ったところ $p = 0.29$ となり、有意な差は確認されなかった（表 1）。ただし、群馬株で攻撃した 4 頭のワクチン接種群の内、1 頭ではウイルス排泄は確認されなかった。ワクチン接種群の攻撃前の血清中抗体価を調べたところ、群馬株で攻撃した群について、ワクチン株である京都株に対しては全頭で80以上の抗体価を有していたものの、攻撃株に対しては10-20であった（表 2）。また、千葉株で攻撃した群について、ワクチン株である和田山株に対しては全頭で160以上の抗体価を有していた

表1 チャレンジ試験でのウイルス排泄量 ($\log_{10}$ TCID₅₀/mL)

Pig No.	ワクチン	攻撃株	Day1	Day3	Day5	Day7	Day14
1	ワクチン群	千葉1-5640株 (H3N2)	1.1	5.6	3	1.1	1.1
2			1.2	5.35	4.48	1.1	1.1
3			1.1	5.35	4.35	1.1	1.1
4			1.6	5.48	4.48	1.1	1.1
5	非ワクチン群		1.1	1.2	4.6	5.09	1.1
6			1.1	1.2	5.2	1.77	1.1
7			1.1	1.1	5.35	1.1	1.1
8			1.1	5.7	5.85	1.3	1.1
9	ワクチン群	群馬8-2986株 (A(H1N1)pdm09)	1.1	3	4.97	1.1	1.1
10			1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
11			1.1	1.1	3.6	1.1	1.1
12			1.1	3.3	4.1	1.1	1.1
13	非ワクチン群		1.1	4.35	4.1	1.1	1.1
14			1.1	1.1	4.35	1.4	1.1
15			1.1	4.91	4.6	1.1	1.1
16			1.1	4.35	4.6	1.1	1.1

※検出限界：1.10

表2 チャレンジ試験前の抗体価

Pig No.	ワクチン	攻撃株	ELISA※	HI抗体価		
				京都株	和田山株	攻撃株
1	ワクチン群	千葉1-5640株 (H3N2)	0.641	80	320	<10
2			0.293	80	160	<10
3			0.176	80	160	<10
4			0.333	80	160	<10
5	非ワクチン群		0.991	<10	<10	<10
6			0.892	<10	<10	<10
7			1.016	<10	<10	<10
8			1.039	<10	<10	<10
9	ワクチン群	群馬8-2986株 (A (H1N1) pdm09)	0.554	40	160	20
10			0.194	80	160	20
11			0.464	320	640	10
12			0.476	80	80	20
13	非ワクチン群		0.888	<10	<10	<10
14			0.975	<10	<10	<10
15			0.994	<10	<10	<10
16			0.963	<10	<10	<10

※検出限界：1.10

ものの、攻撃株に対しては検出限界以下となった（表2）。

4. 考察

本研究により、近年の日本において3系統のHA遺伝子を有するウイルスが循環していることが明らかとなった。各ウイルスが分離される数や地理的範囲の違いから、HA遺伝子の系統により流行状況に違いがあると考えられる。A (H1N1) pdm09ウイルスのHA遺伝子を有するIAV-Sの分離数は1A.1 Classical swine系統のH1遺伝子と比較すると少ないものの、国内で広範囲に渡って検出されている。加えて、このウイルスと遺伝子再集合を起こしたIAV-Sがブタから分離されている。このことは、現在ヒトで季節性インフルエンザウイルスとなっているA (H1N1) pdm09ウイルスがヒトからブタへ頻繁に伝播していることを示している。しかしながら、ブタへの適合が完全ではないために、発生が小規模かつ散発的であったと考えられる。一方で、1A.1 Classical swine系統のH1遺伝子は1970年以降国内で固有の進化を遂げており、他国のIAV-Sとは遺伝的に大きく異なっている。この系統のウイルスは国内のブタの中で適合し独自の進化を遂げ、国内の豚群で維持されていると考えられる。このことが、この遺伝子を有するIAV-Sが関東地方の豚群において最も流行している理由として挙げられる。H3N2亜型のIAV-Sは、分離数は少ないものの、サーベイランス期間を通じて得られた株が全て近縁であった。そのため、1A.1 Classical swine系統のH1遺伝子を有するIAV-Sと比べると規模は小さいものの、国内の豚群に定着していると考えられる。

現在、養豚場でIAV-Sをコントロールするために最も実施される戦略の一つがワクチン接種である。国内で製造しているワクチンシードの元となった株は1960-70年代の分離株に由来しており、現在流行しているIAV-Sとは遺伝的に離れている。本研究において行ったチャレンジ試験において、H1N1亜型の一つである群馬株に対しては4頭中1頭のウイルス排泄を完全に抑えたことから、ある程度の効果は見込めるものと考えられる。一方で、千葉株についてウイルス排泄における有効性を確認できなかった。また、Classical swine系統のH1遺伝子を有する数株のIAV-Sについて同様の実験をした際、ウイルス排出を抑制出来ない株が存在していることが分かっている。このことから、日本で独自に進化を続けていく中で変異が蓄積し、当時流行していた株から抗原性が離れたウイルス株に対しては効果が見込めないことが示唆された。現在も進化を続けている1A.1 Classical swine系統のH1亜型IAV-SやH3亜型IAV-S、ヒトから頻繁に伝播するA (H1N1) pdm09ウイルスに対応するためには、国内のIAV-S流行状況をリアルタイムで把握し、近年流行するウイルスに見合う効果的なワクチン株を検討する必要がある。

5. 利益相反状態の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

6. 謝辞

本研究は、JRA 畜産振興事業ならびに農林水産省の委託事業“家畜の伝染病の国内侵入と野生動物由来リスクの管理技術の開発”で行われた。また、養豚場で

の豚鼻腔拭い液の採取を行っていただいた日本養豚開業獣医師協会、ご協力いただいた養豚場関係者に深謝する。

7. 引用文献

- 1) Garten RJ, et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325: 197-201.
- 2) Ito T, et al. (1998) Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 72: 7367-7373.
- 3) Vincent A, et al. (2014) Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health*, 61: 4-17.