

＜別紙様式 2＞研究実績報告書

令和 5 年度 安全な農畜水産物安定供給のための
包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業
「新たな人獣共通感染症の発生に備えた事前リスク評価」
研究実績報告書

I. 研究の進捗状況等

- (1) 先行研究で 2 年以上継続して豚インフルエンザウイルス (IAV-S) が検出されている 2 農場 (農場 007 及び 012) において、現地実証試験への参加承諾を得た。実証試験へ向けて農場 007 分離ウイルス株対応ワクチンの作製を外部委託により進めている。
- (2) わが国の牛において 50%近い抗体陽性率が得られており、FluD が国内に広く浸潤していることがわかった。HEF を認識する各単クローン性抗体 (mAb) を用いた解析およびリバーシジェネティクスで作出した組換えウイルスを用いた検証により、FluD の中和抗原構造を明らかにした。また高温感受性 (低温増殖性) の FluD 組換えウイルス (rD/OK-AL) の鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチン能について、不活化剤型との比較を含めてマウスモデルにより検証し、rD/OK-AL が鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチンの候補株として、きわめて有望であることが示唆された。
- (3) 牛コロナウイルスと馬コロナウイルスの家畜間における浸潤度を比較した結果、牛コロナウイルスは馬コロナウイルスに比べて高頻度到家畜間に浸潤している実態を明らかにした。また野生動物を対象とした調査に関して、牛コロナウイルス陽性検体は確認されなかった。
- (4) これまでに当初計画 (令和 3~4 年度で豚・鶏・牛で計 1,700 検体) を大きく上回る計 4,283 検体の家畜糞便検体を収集した。令和 4 年度までに家畜への浸潤状況調査で同定された *Escherichia albertii* 33 株および以前に担当者らが収集した地鶏・豚由来 9 株 (計 42 株) について、ドラフトゲノム配列の取得を完了した。

1. 豚インフルエンザに効果的な新規ワクチンプログラムの確立

先行研究で 2 年以上 (農場 007 : 2015 年 11 月から 2019 年 5 月までの約 3 年 6 か月間、農場 012 : 2015 年 11 月から 2019 年 2 月までの約 3 年 3 か月間) 継続して豚インフルエンザウイルス (IAV-S) が検出されている 2 農場 (農場 007 及び 012) において、現地実証試験への参加承諾を得た。次いで、1 年間に亘り定期的なモニタリングを実施し、飼育ステージ毎のウイルス遺伝子検出率を算出した結果、農場 007 の分娩及び離乳豚舎でのウイルス検出率が高いことを明らかにした。そこで、実証試験へ向けて農場 007 分離ウイルス株対応ワクチンの作製を外部委託により進めている。一方、農場 012 では、僅かに離乳豚からウイルスが検出された。しかし、飼育ステージの検証が不十分であるため、定期的なウイルスモニタリングを継続する。

2. D型インフルエンザウイルスのヒトへの潜在的感染性の評価

- (1) D 型インフルエンザウイルスの疫学解析

わが国の牛において 50%近い抗体陽性率が得られており、FluD が国内に広く浸潤していることがわかった。本年度は、これまで調べていない地域の牛の調査を進めた。新たに BRDC 患畜牛から分離された日本株のゲノム解析を進めた。また市販および岩手医大、仙台医療

センターから人血清を入手した。

(2) D型インフルエンザウイルスのヒト細胞増殖性の解析

ウイルスの宿主域変化は、レセプター選択性とゲノム複製効率の宿主特異性が重要である。本年度は、野生型 FluD および HEF 変異に特化した検証が可能な A/D キメラウイルス (A/D-HEF:venus) を人呼吸器由来培養細胞で継代することで増殖性が上昇した複数の継代馴化ウイルスを解析したところ、複数の HEF 遺伝子変異を検出した。

(3) D型インフルエンザワクチン開発のための基礎解析

HEF を認識する各単クローン性抗体 (mAb) を用いた解析およびリバーシジェネティクスで作出した組換えウイルスを用いた検証により、FluD の中和抗原構造を明らかにした。本成果は、抗原性の広いワクチン候補株の選択に貢献する高温感受性 (低温増殖性) の FluD 組換えウイルス (rD/OK-AL) の鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチン能について、不活化剤型との比マウスモデルにより検証し、rD/OK-AL が鼻腔噴霧型の弱毒生ワクチンの候補株として、きわめて有望であることが示唆された。

3. コロナウイルスの制御法確立に向けた研究開発

(1) 家畜ベータコロナウイルスの浸潤度調査および感染リスク評価

令和4年度に収集した家畜の検体を用いて、牛コロナウイルスと馬コロナウイルスの家畜間における浸潤度を比較した結果、牛コロナウイルスは馬コロナウイルスに比べて高頻度到家畜間に浸潤している実態を明らかにした。コロナウイルスは採取された年や地域によってその流行が変化するため、昨年度に引き続き今年度も6道県から収集した家畜の検体を用いて、今年度は牛コロナウイルスに限定して調査を実施し、それぞれの家畜および地域におけるより正確な浸潤度を把握することに努めた。

野生動物の検体に関して、これまでハクビシン、アライグマなどの野生小型動物の検体を用いた調査では家畜コロナウイルスの浸潤が確認できなかった。そこで、今年度は昨年度に引き続き農場での出現情報が多く認められるエゾシカを対象に調査を実施した。加えて、エゾシカは北海道のみにしか生息しないため、本州における家畜コロナウイルスの野生動物への浸潤を考慮してイノシシを対象とした調査も実施した。

(2) 家畜ベータコロナウイルスの制御に向けた分子基盤の構築

構築した牛コロナウイルスの全遺伝子を挿入した細菌人工染色体 (BAC) ベクターを用いて感染性 cDNA クローンからの感染性粒子の作出を試みた。細胞内で BAC ベクターからウイルス由来の転写翻訳を確認するために、牛コロナウイルスの M 遺伝子をナノルシフェラーゼに置換した M-nano luciferase コンストラクトを作製した。作製した M-nano luciferase コンストラクトを HEK293T 細胞と VeroE6/TMPRSS2 細胞と Huh7 細胞に導入し、ナノルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Huh7 細胞以外の細胞でナノルシフェラーゼ活性が認められたことから、組換えウイルスの作出には HEK293T 細胞あるいは VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いることが良いとわかった。今後、培養上清中からの感染性粒子の回収に向けての改善を行う。また、新しい株の感染性 cDNA クローンの作出も開始し、作製した感染性 cDNA の全遺伝子配列の解析を行った。

4. *Escherichia albertii*の家畜における浸潤状況調査およびリスク評価

(1) 家畜における *Escherichia albertii* の浸潤状況調査および性状解析

研究は順調に進捗し、これまでに当初計画（令和3～4年度で豚・鶏・牛で計1,700検体）を大きく上回る計4,283検体の家畜糞便検体を収集した。当初計画の2倍を超える検体を収集できたことから、令和5年度前半も未実施分約1,000検体からの菌分離を継続する。菌分離と並行して、当初計画の通りに分離株の全ゲノム解析を行い、病原性関連遺伝子や薬剤耐性遺伝子の解析を進める。

(2) *Escherichia albertii* の比較ゲノム解析および食中毒リスク評価

これまでの研究は順調に進捗し、令和4年度までに家畜への浸潤状況調査（4001）で同定された *Escherichia albertii* 33株および以前に担当者らが収集した地鶏・豚由来9株（計42株）について、ドラフトゲノム配列の取得を完了した。また、それらの配列情報を用いて、国内分離株（主に野鳥やヒト臨床由来株）を比較対象とした全ゲノム進化系統解析や薬剤耐性関連遺伝子群の分布状況について解析した。