

# D型インフルエンザ

- D型インフルエンザウイルスの発見
- ウイルス分子性状と病原性
- わが国におけるD型インフルエンザ疫学調査
- 日本株の分離と性状解析
- D型ウイルス粒子内ゲノム構造

堀本泰介

東京大学大学院  
農学生命科学研究科  
獣医微生物学教室

# インフルエンザウイルス

型	A	B	C	D
亜型	HA (H1-H18) NA (N1-N11)	なし	なし	??
宿主	ヒト ブタ ウマ 鳥 その他	ヒト (アザラシ)	ヒト (ブタ)	ウシ ブタ ・ ・
ヒト流行	季節性 パンデミック	季節性	小規模	??

# D型インフルエンザウイルス(Flu D)

OPEN ACCESS Freely available online

February 2013 | Volume 9 | Issue 2 | e1003176

PLOS PATHOGENS

## Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses

Ben M. Hause<sup>1,2\*</sup>, Mariette Ducatez<sup>3</sup>, Emily A. Collin<sup>1</sup>, Zhiguang Ran<sup>2,4</sup>, Runxia Liu<sup>2,4</sup>, Zizhang Sheng<sup>5</sup>, Anibal Armien<sup>6</sup>, Bryan Kaplan<sup>3</sup>, Suvobrata Chakravarty<sup>5</sup>, Adam D. Hoppe<sup>5</sup>, Richard J. Webby<sup>3</sup>,

Ra

呼吸器疾患のブタから分離  
(C/swine/Oklahoma/1334/2011)

March/April 2014 Volume 5 Issue 2 e00031-14

mBio mbio.asm.org

## Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the *Orthomyxoviridae* Family

Ben M. Hause,<sup>a</sup> Emily A. Collin,<sup>a,b</sup> Runxia Liu,<sup>b,c</sup> Bing Huang,<sup>b,c,d</sup> Zizhang Sheng,<sup>e</sup> Wuxun Lu,<sup>b,c</sup> Dan Wang,<sup>b,c</sup> Eric A. Nelson,<sup>b,c</sup> Feng Li<sup>b,c</sup>

AGID 抗原性がFlu Cとは異なる。  
ウシが主要な宿主動物

# 分離ウイルス

1. A, B, C型と免疫拡散法で抗原交差しない。
2. 7本鎖。
3. C型との遺伝学的距離が、A型とB型の差と同じくらい離れている。
4. C型と遺伝子交雑しない。
5. ゲノム分節末端配列がC型と異なる。
6. M1の転写の仕方がC型と異なる。
7. ウシ, ヒツジ, ヤギに感染する。
8. ヒトへの感染性が明らかでない。
9. ヨーロッパ、アジアでも見つかる。

→ *Influenza D virus* (ICTV 2016)

# *Orthomyxoviridae*の分類 (ICTV 2017)

Genus: *Alphainfluenzavirus*

Species: *Influenza A virus*

human influenza A virus, avian influenza A virus,  
swine influenza A virus, equine influenza A virus,  
canine influenza A virus

Genus: *Betainfluenzavirus*

Species: *Influenza B virus*

human influenza B virus

Genus: *Gammainfluenzavirus*

Species: *Influenza C virus*

human influenza C virus

Genus: *Deltainfluenzavirus*

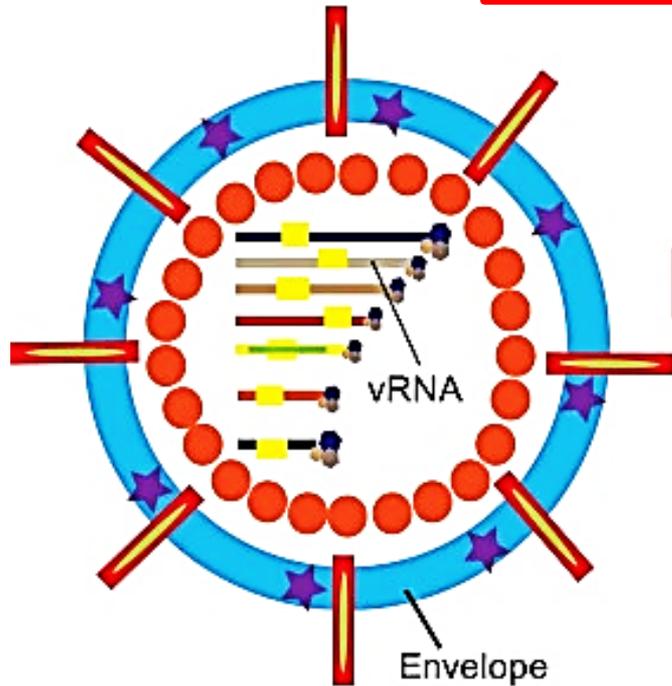
Species: *Influenza D virus*

bovine influenza D virus, swine influenza D virus

その他のGenus: *Isavirus, Quaranjavirus, Thogotovirus*

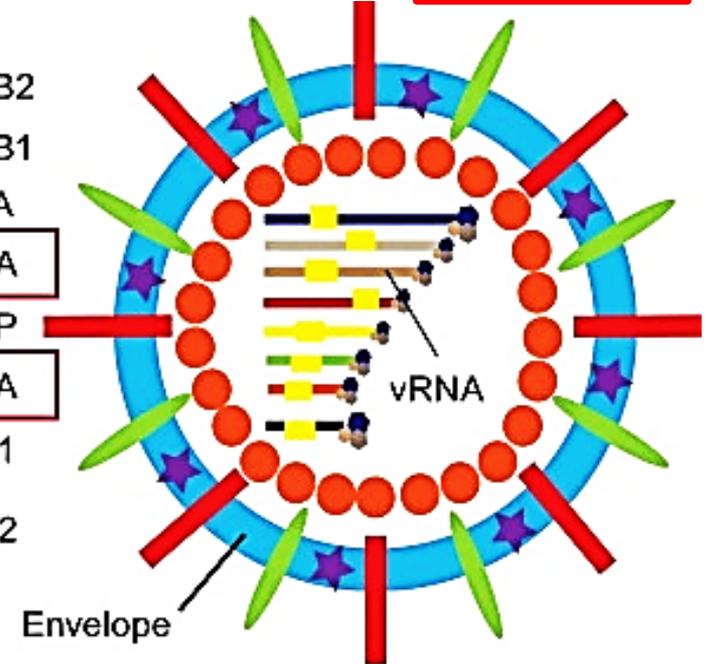
# インフルエンザウイルスの構造

Flu C/D **7分節**



- PB2
- PB1
- P3
- HEF
- NP
- M1
- ★ CM2

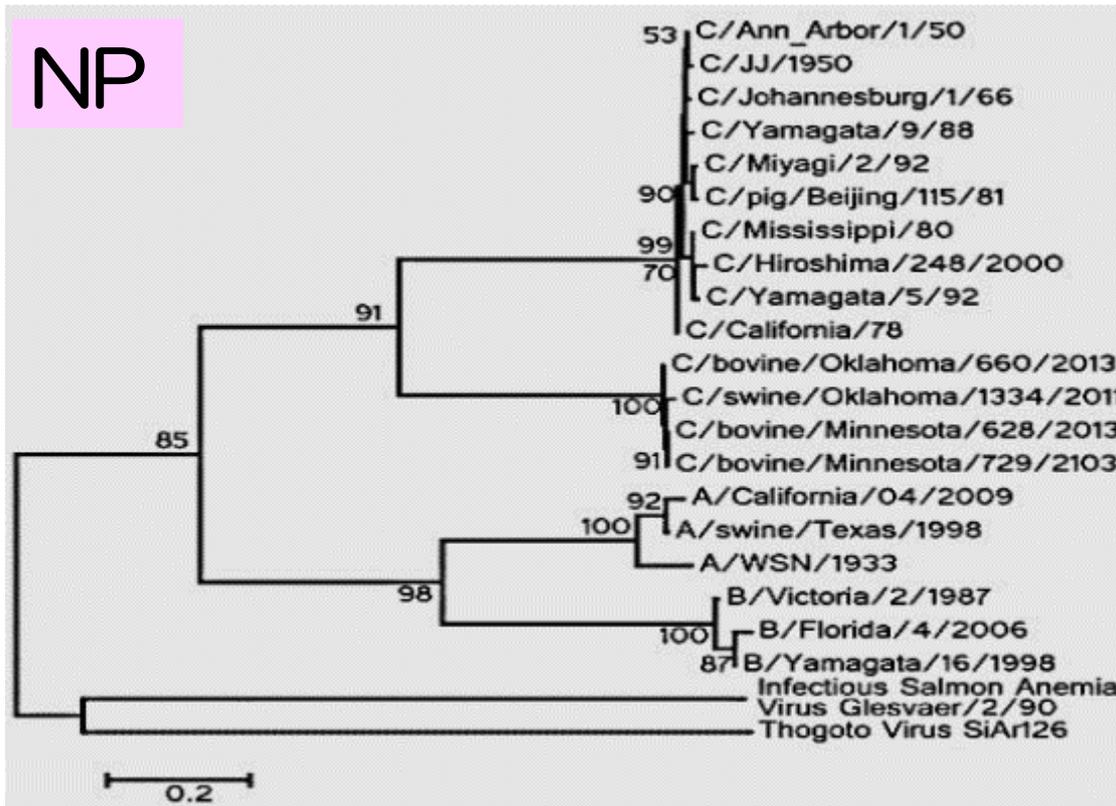
Flu A/B **8分節**



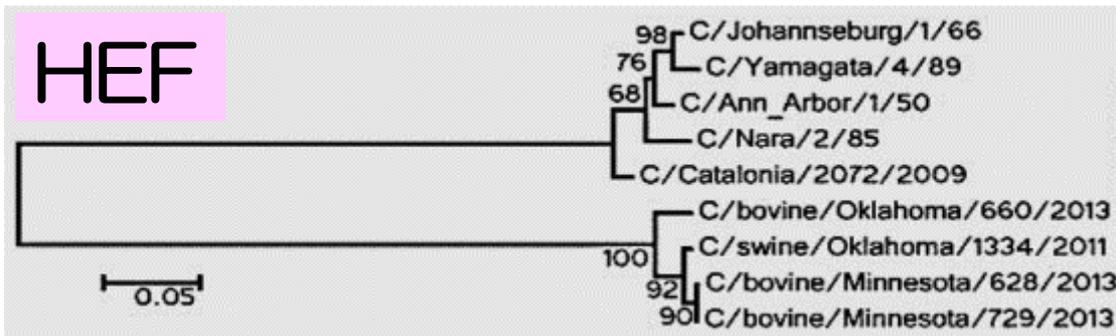
- PB2
- PB1
- PA
- HA
- NP
- NA
- M1
- ★ M2

HEF:  
hemagglutinin-esterase-fusion

# オルソミクソウイルス系統樹



- Flu C
- Flu D
- Flu A
- Flu B
- Isa, Thogoto

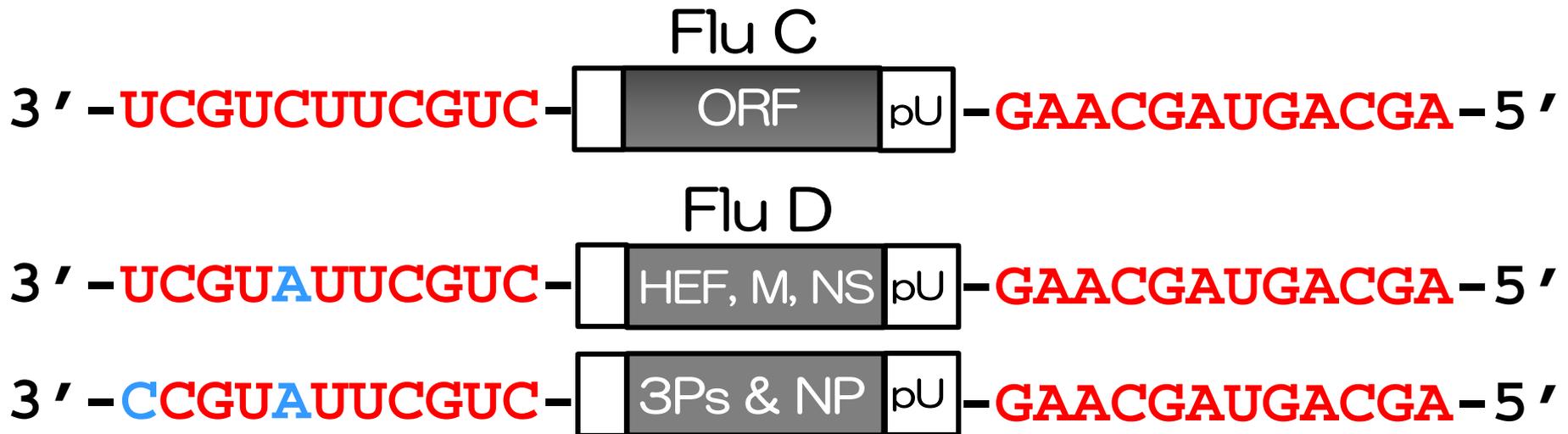


- Flu C
- Flu D

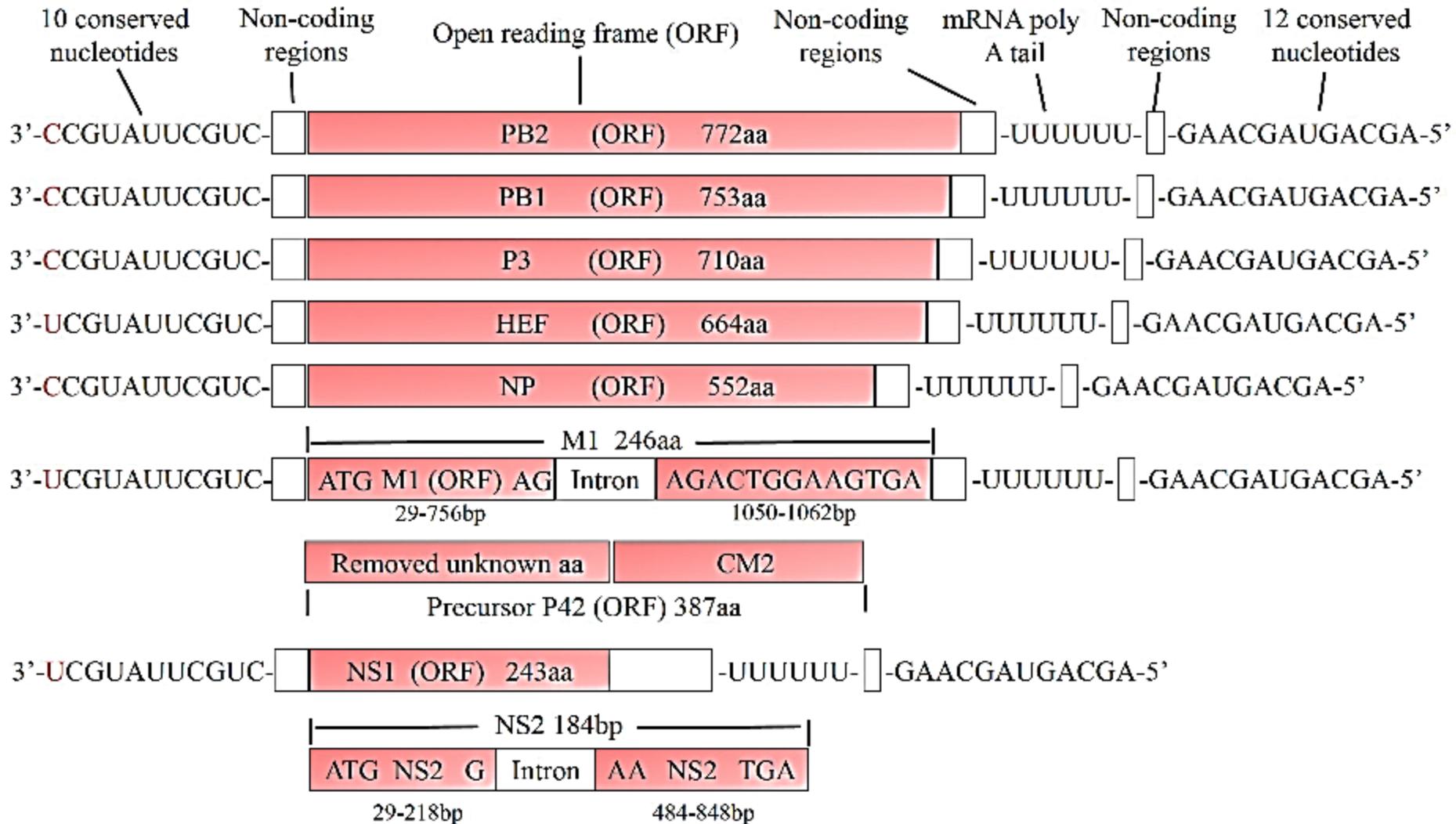
# Flu D vs. Flu C

タンパク質	PB2	PB1	P3	HEF	NP	P42	NS1/2
相同性 (%)	53	70	50	53	40	38	33/29

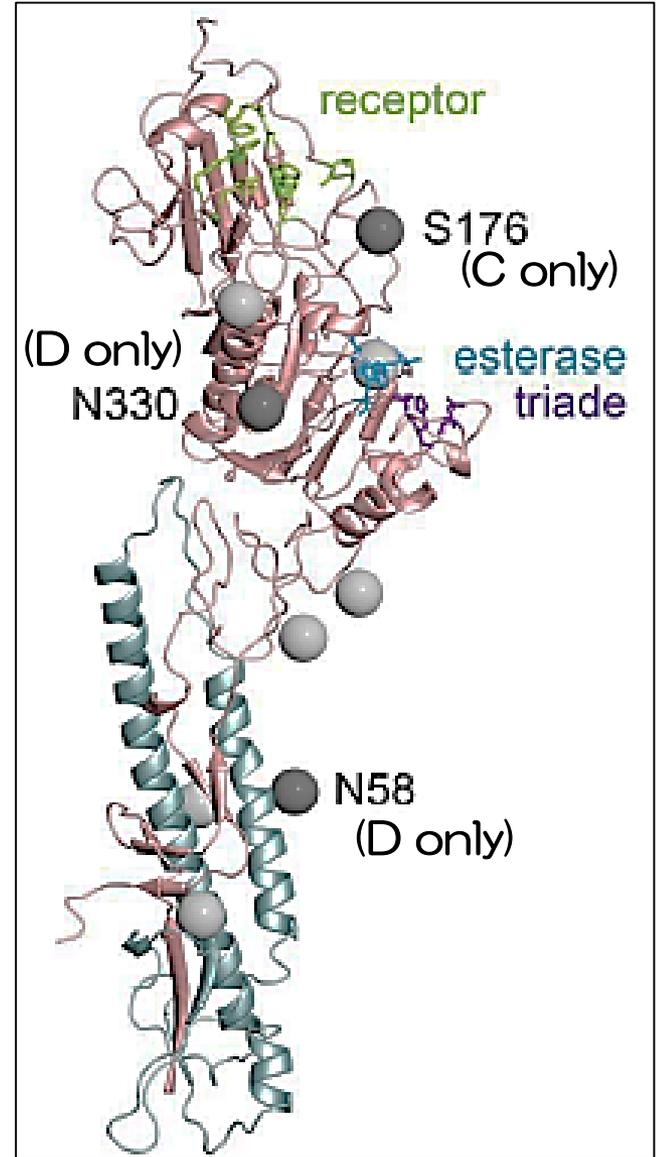
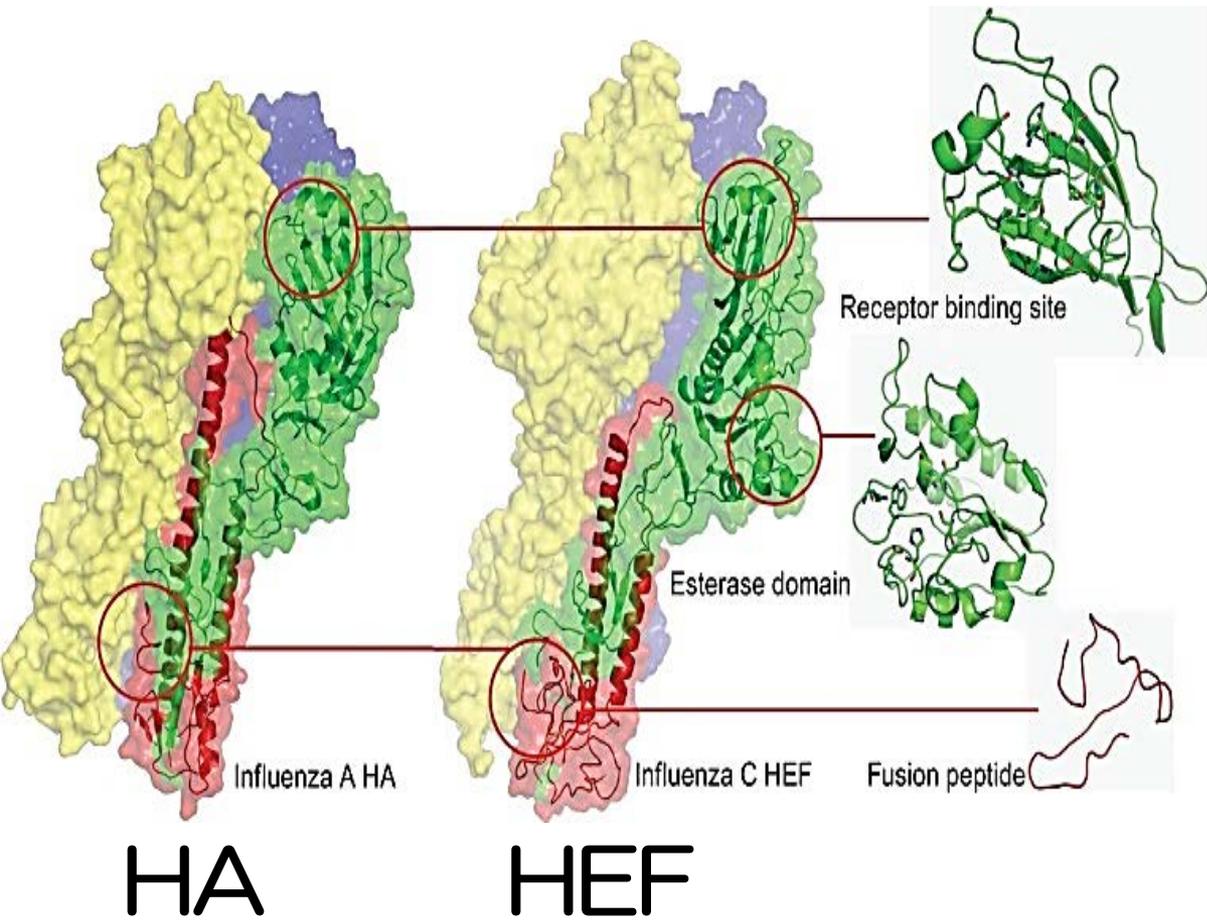
- Terminal sequence



# Flu Dのゲノム構造



# Flu A/B HA vs. Flu C/D HEF

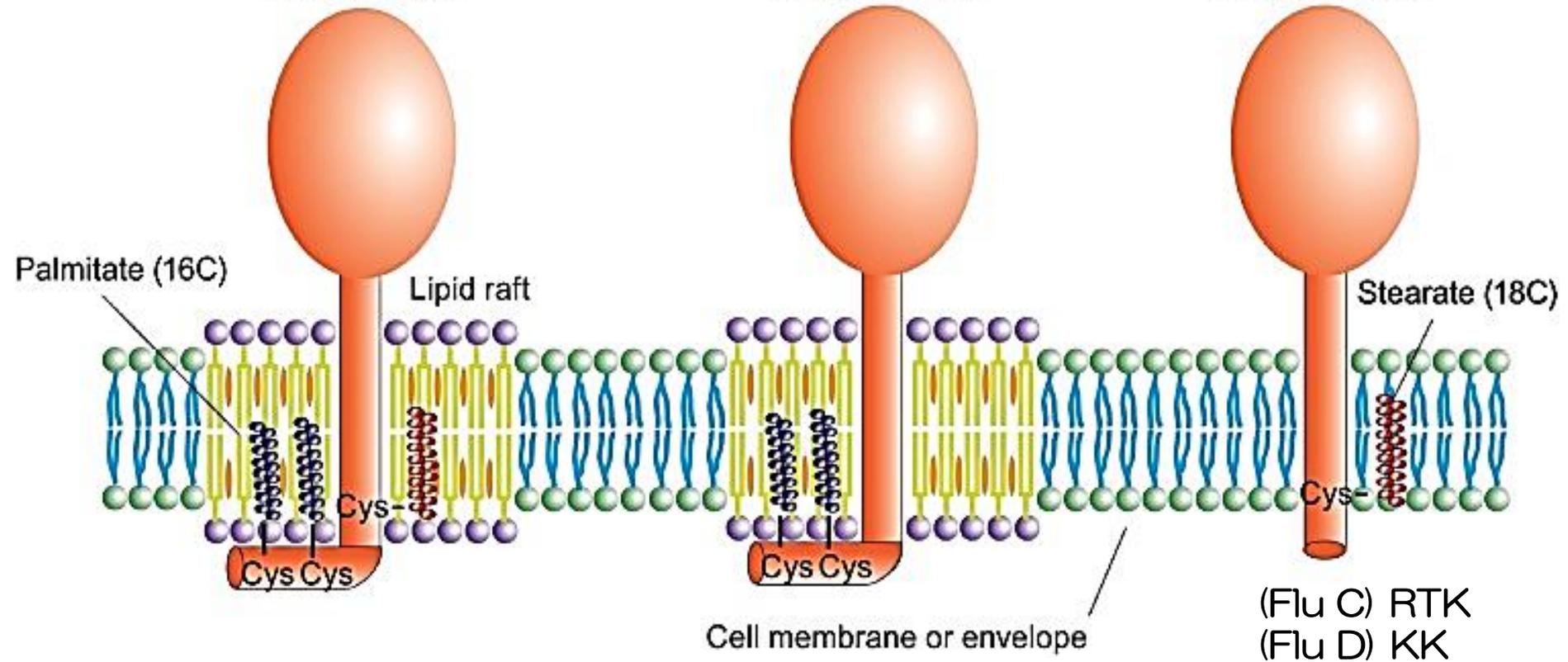


# HA vs. HEF

Influenza A HA

Influenza B HA

Influenza C HEF



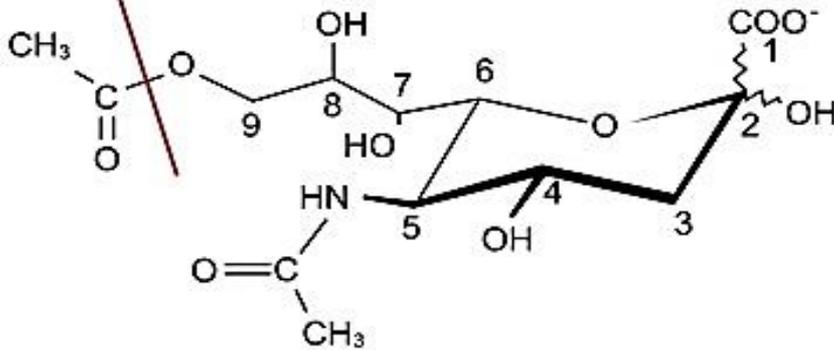
Different acylation and lipid raft association of HA or HEF protein.

Wang and Veit, Protein Cell, 2016

# 細胞レセプター: HEF vs. HA

エステラーゼ切断部位

HEF esterase activity

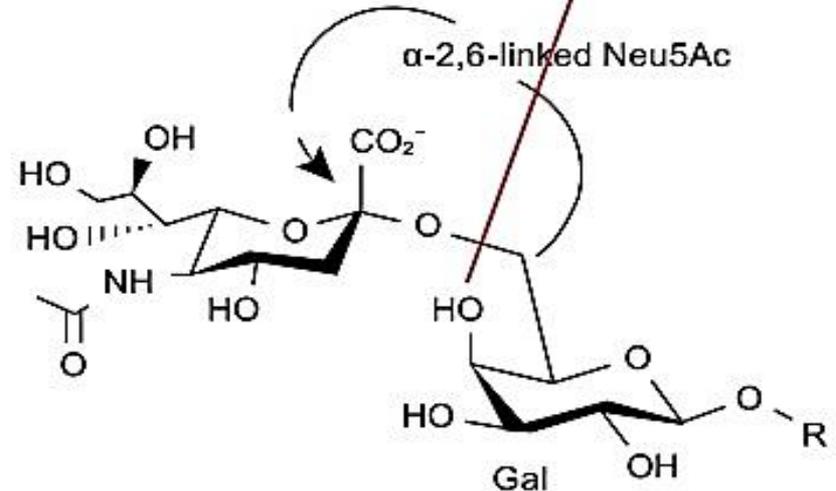


Influenza C receptor  
9-O-acetyl-sialic acid

Flu C, Dのレセプター  
9-O-アセチルシアル酸

ノイラミニダーゼ切断部位

NA neuraminidase activity



Influenza A, B receptor  
 $\alpha$ -2, 3 or 2, 6 linked-sialic acid

Flu A, Bのレセプター  
 $\alpha$ 2,3/2,6-シアル酸

# 牛呼吸器病症候群（BRDC）

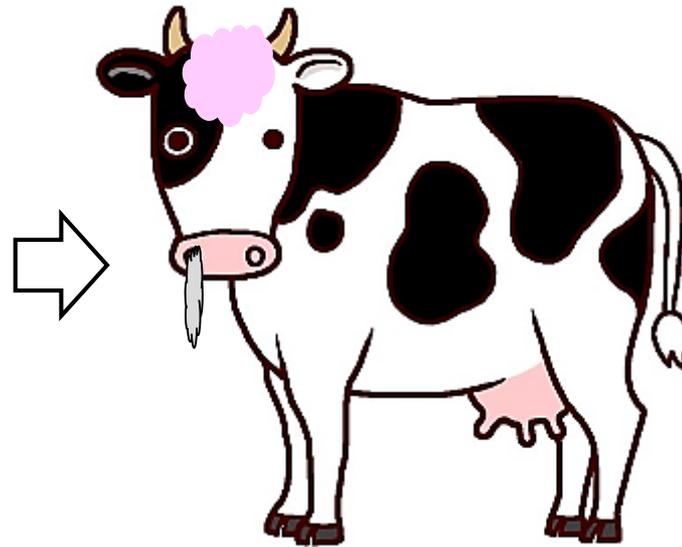
ウイルス、細菌、ストレス等の複合的要因によって発生

例：輸送熱、流行性肺炎

世界全体で3,600億円以上/年の経済的被害

## ウイルス

牛伝染性鼻気管炎ウイルス  
牛ウイルス性下痢ウイルス  
牛パラインフルウイルス3  
牛RS ウイルス  
牛アデノウイルス  
牛コロナウイルス  
牛鼻炎A/Bウイルス  
牛パルボウイルス



## 細菌

マンヘミア  
マイコプラズマ  
パスツレラ  
ヒストフィルス

## 環境因子

ストレス、気温  
湿度、ガス  
ほこり

## 臨床症状

- 急性期：食欲消失、高熱、呼吸促拍、沈鬱、咳、鼻汁
- 慢性期：衰弱、咳、呼吸困難

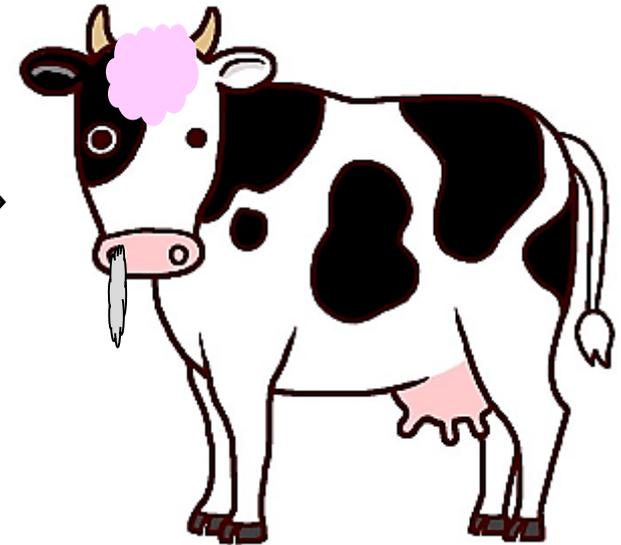
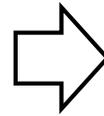
# 牛呼吸器病症候群（BRDC）

- ワクチンを接種してもBRDCは発生する。

## ウイルス

牛伝染性鼻気管炎ウイルス  
牛ウイルス性下痢ウイルス  
牛パラインフルウイルス3  
牛RS ウイルス  
牛アデノウイルス  
牛コロナウイルス  
牛鼻炎A/Bウイルス  
牛パルボウイルス

混合  
ワクチン



- メタゲノム解析で、これらよりもD型インフルエンザウイルスの方がBRDC牛から高頻度に検出（2016）

⇒ 現在のBRDCの主要病原体はFlu Dである可能性

# D型インフルエンザウイルスが検出された国 (2015年まで)



日本の牛におけるD型ウイルスの  
疫学調査

# D型ウイルス特異抗体の検出

血清（血漿）

茨城県下の牧場飼育の乳用牛（ホルスタイン）28頭  
RDE・非働化处理

ウイルス

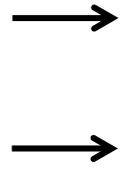
D/swine/Oklahoma/1334/2011  
（カンザス大 Hause博士より分与）

0.6%七面鳥赤血球を用いてHI試験（ $\geq 1:40$ を陽性）

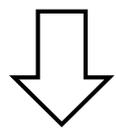
No.	移動歴	採血時 年齢	H1価
			1/8採血
1	茨城	5y6m	<40
2	茨城	4y5m	<40
3	茨城	3y11m	<40
4	茨城	3y10m	<40
5	茨城	3y4m	<40
6	茨城	3y4m	<40
7	茨城	3y4m	<40
8	茨城	3y3m	<40
9	茨城	3y1m	<40
10	茨城	2y2m	<40
11	茨城	2y1m	<40
12	茨城	2y1m	<40
13	茨城	2y0m	<40
14	茨城	1y12m	<40
15	茨城	1y7m	<40
16	茨城	1y3m	<40
17	茨城	1y0m	<40
18	茨城	0y11m	<40
19	茨城	0y8m	<40
20	茨城	0y7m	<40
21	北海道	7y9m	80
22	北海道	8y0m	160
23	茨城	6y11m	80
24	茨城	6y3m	640
25	北海道	7y10m	160
26	茨城・北海道	1y11m	80
27	茨城・北海道	1y10m	80
28	茨城	9y0m	160

過去にFlu Dに感染  
わが国にもFlu Dは存在

No.	HI価	
	1/8採血	2/3採血
1	<40	40
2	<40	80
3	<40	160
4	<40	<40
5	<40	160
6	<40	80
7	<40	160
8	<40	320
9	<40	160
10	<40	160
11	<40	160
12	<40	80
13	<40	80
14	<40	160
15	<40	160
16	<40	160
17	<40	80
18	<40	40
19	<40	320
20	<40	80
21	80	160
22	160	80
23	80	160
24	640	320
25	160	80
26	80	160
27	80	40
28	160	80



鼻スワブRT-PCR 陽性



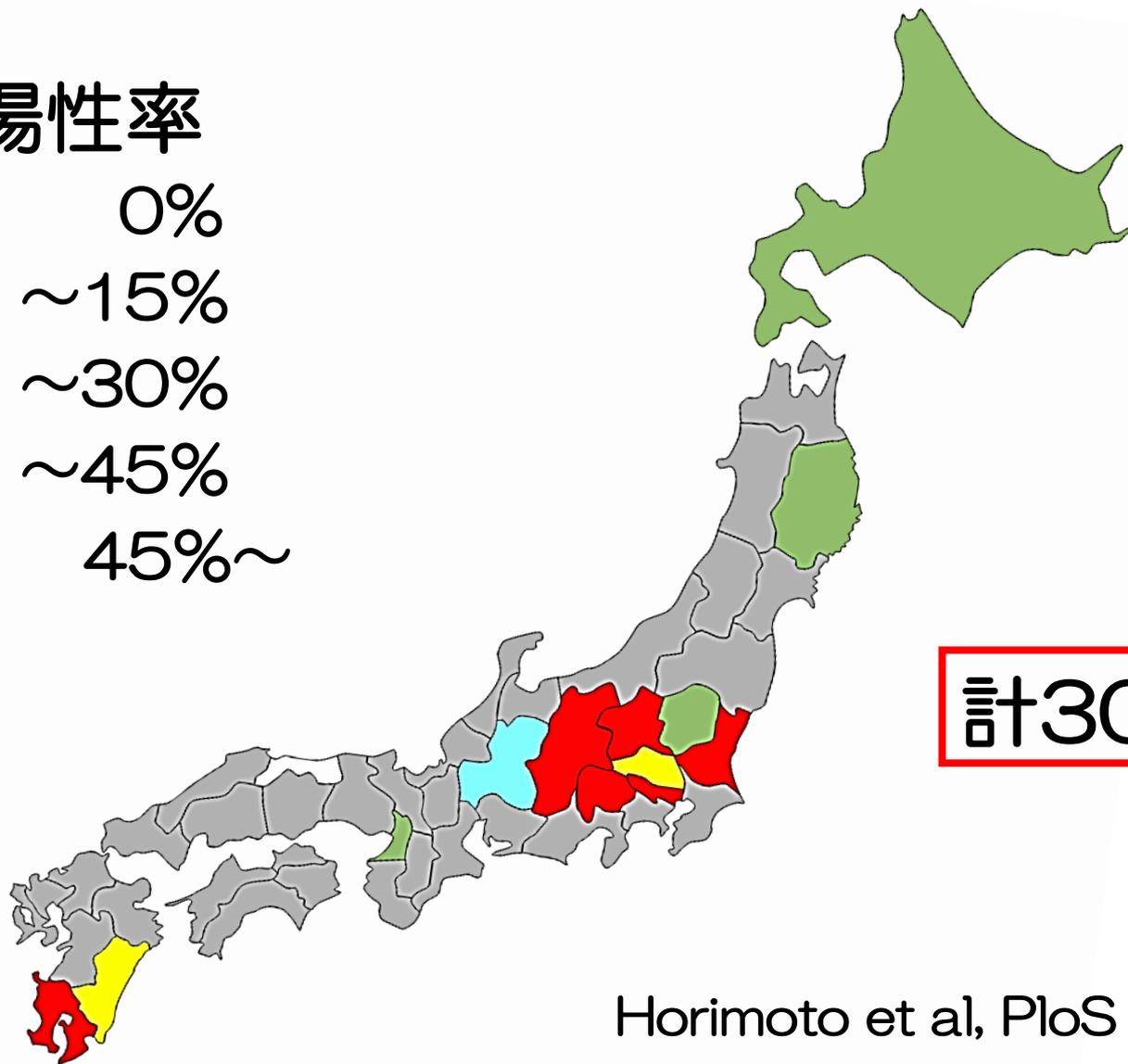
ゲノム全塩基配列を決定 (茨城株)  
ウイルス分離は陰性

本牧場において  
Flu Dの流行が  
あった。

# 日本における抗体保有状況まとめ

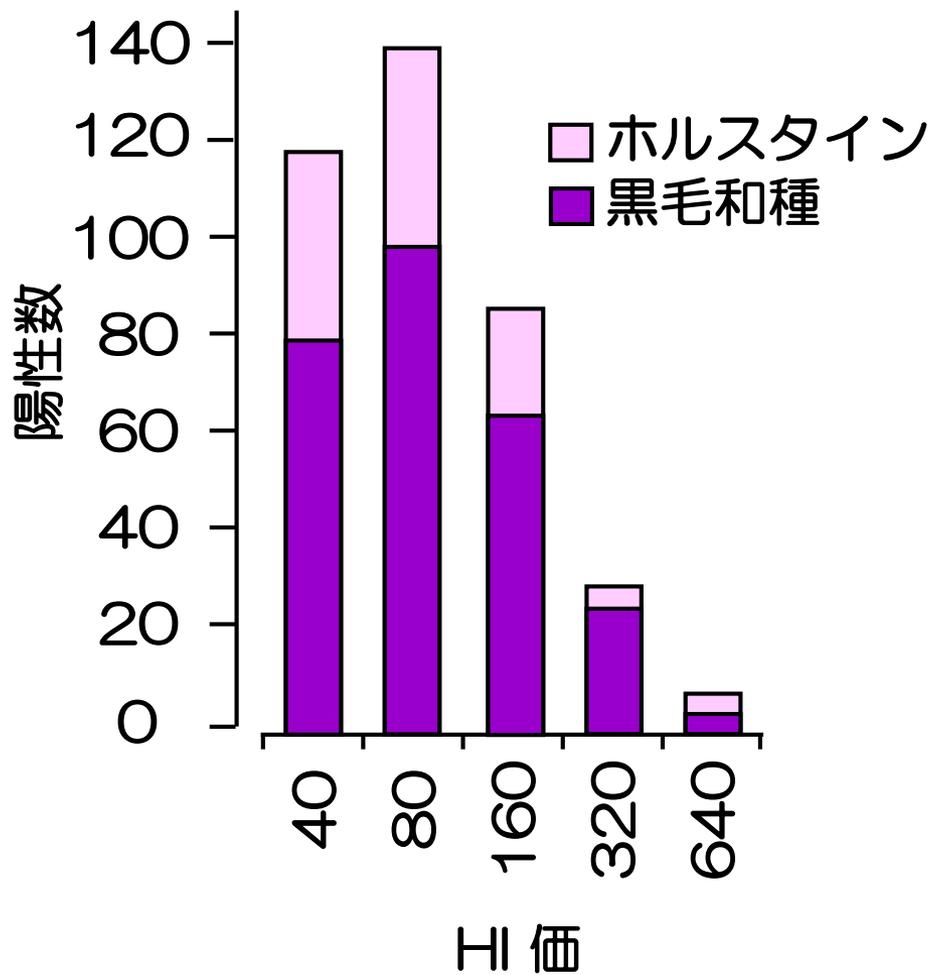
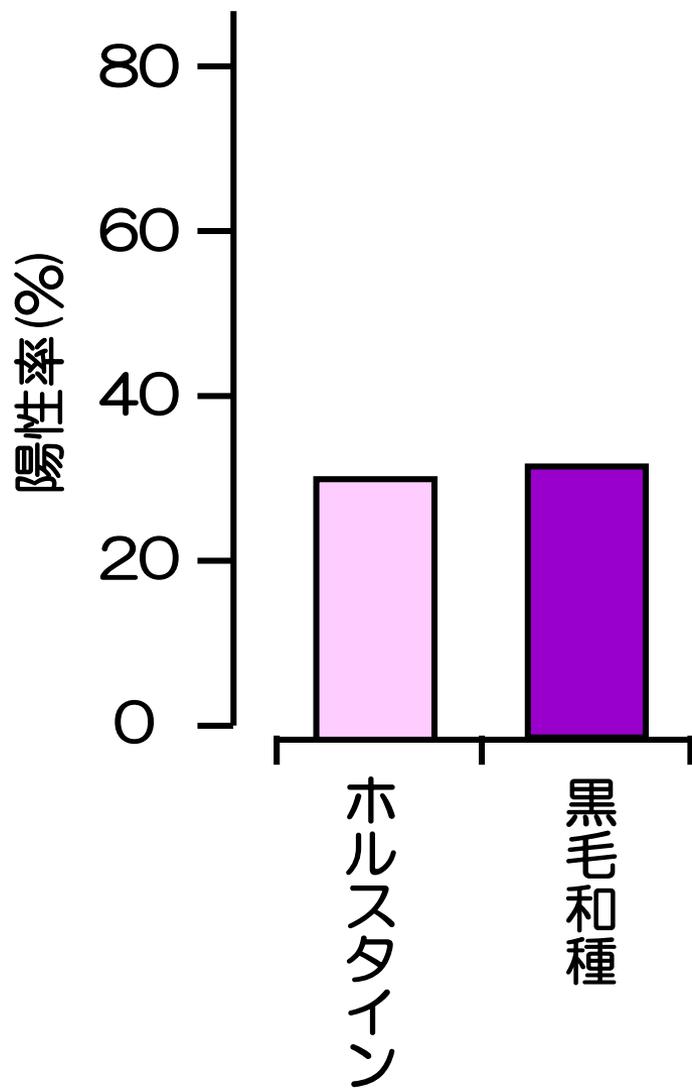
## 陽性率

- 0%
- ~15%
- ~30%
- ~45%
- 45%~

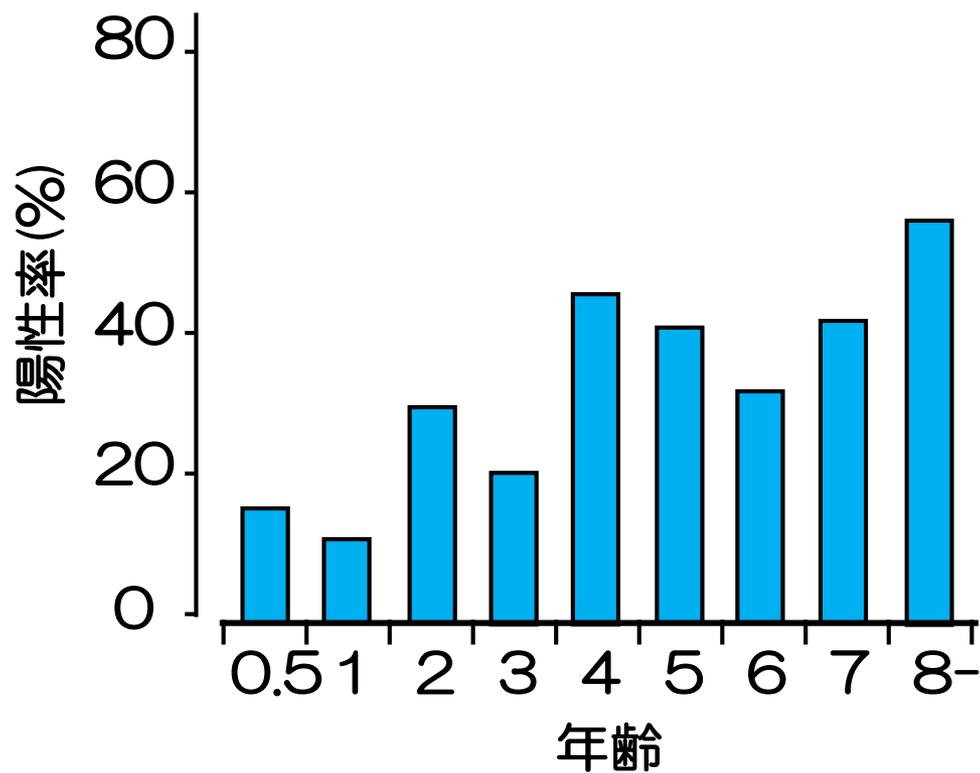
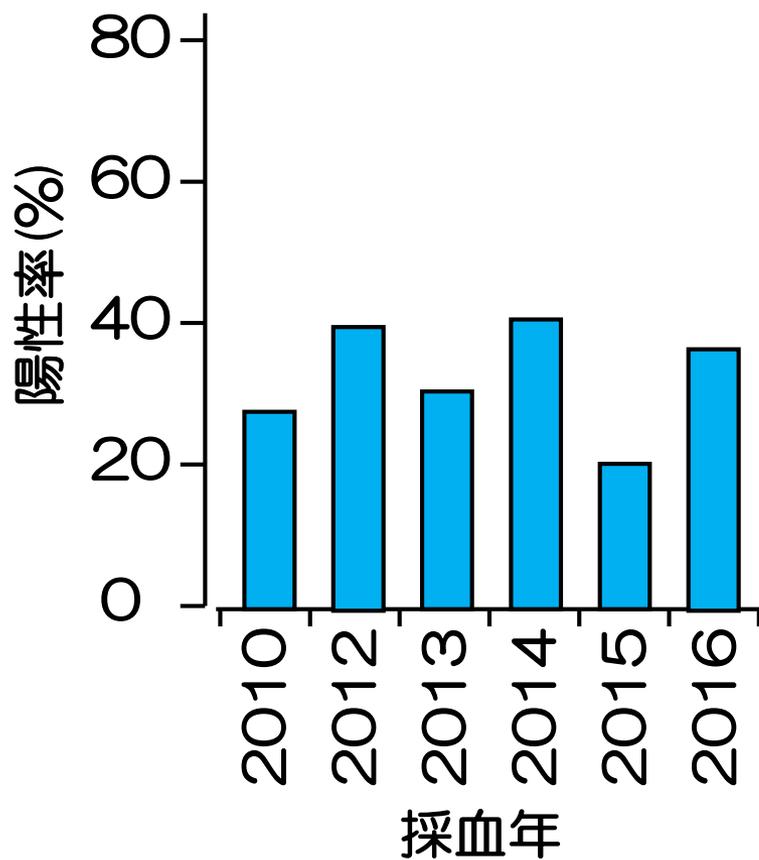


計30.4%

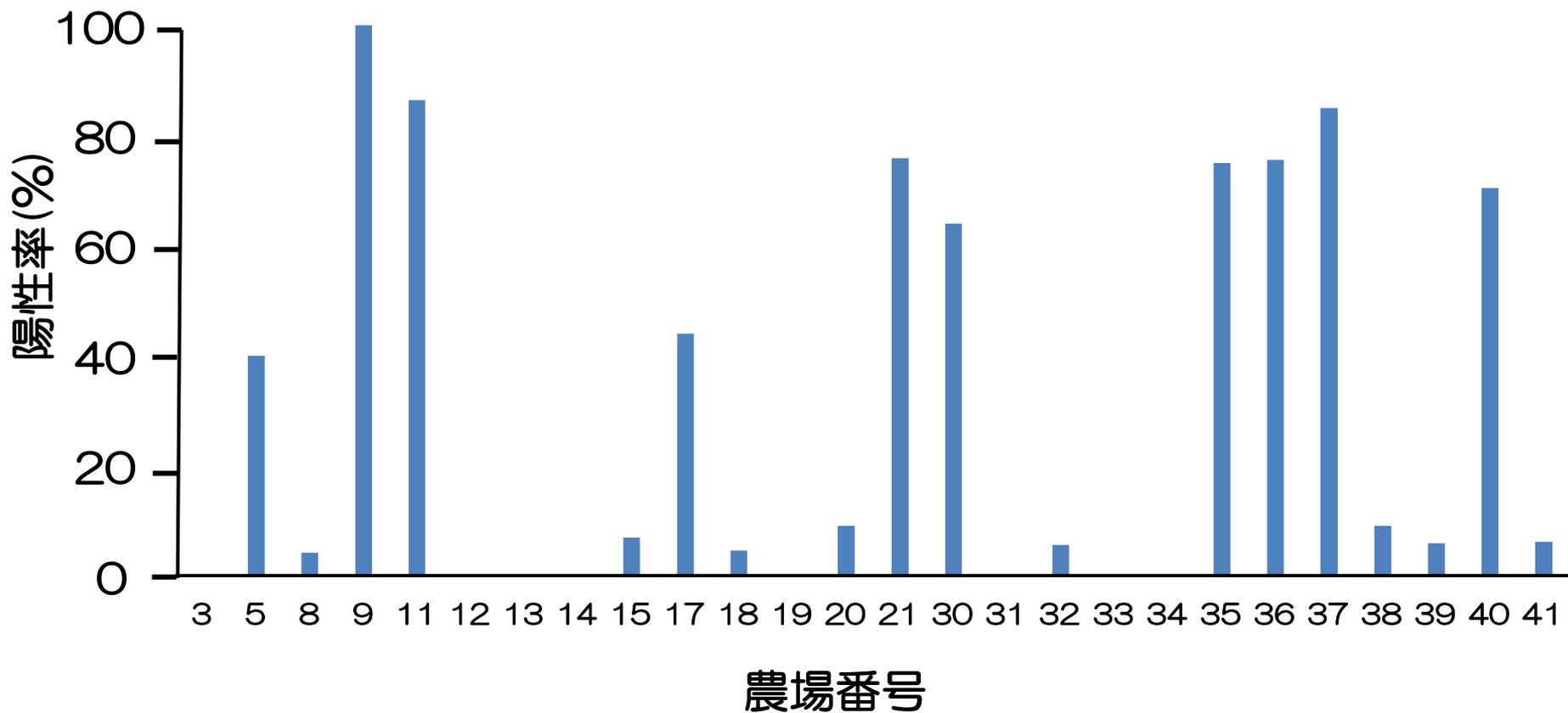
# D型ウイルス抗体陽性率



# D型ウイルス抗体陽性率

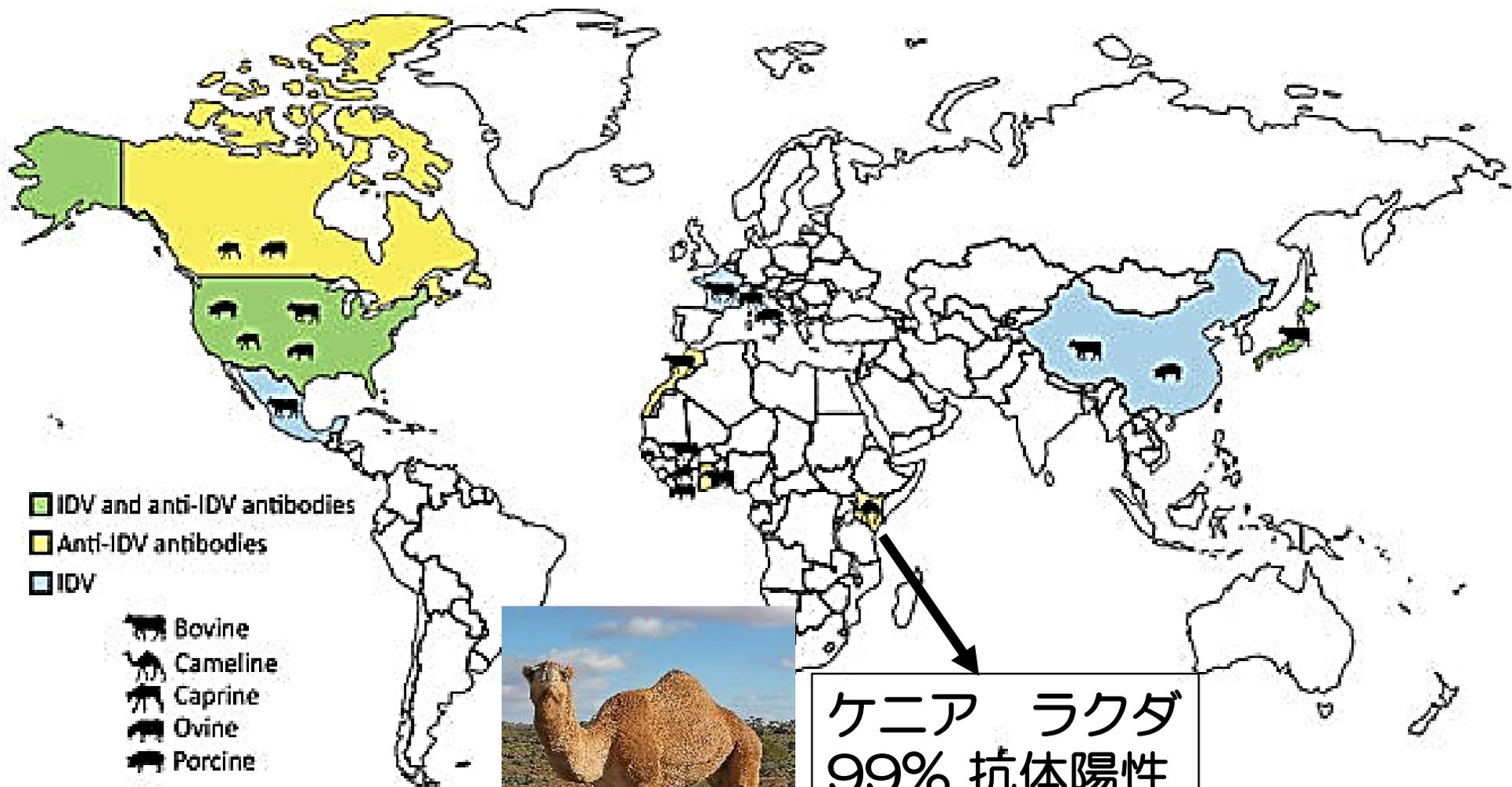


# 宮崎県内農場別抗体陽性率



→ 高い水平伝播性を示唆

# Flu Dが検出された国（2017年まで）



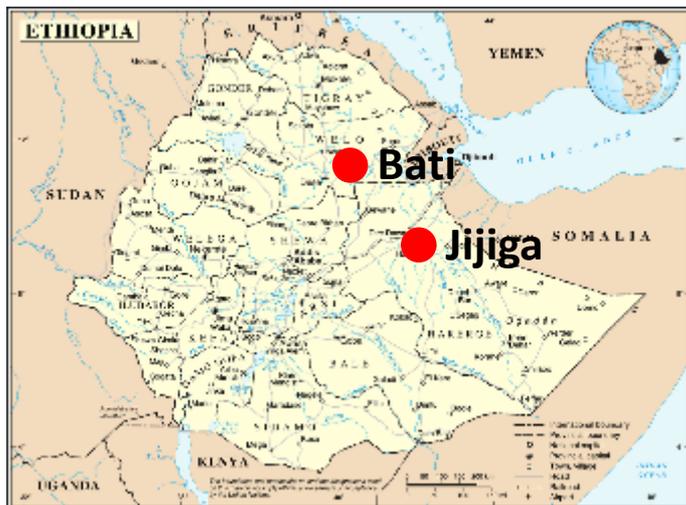
ケニア ラクダ  
99% 抗体陽性  
自然宿主??

# エチオピアのヒトコブラクダ血清



## 泉對博先生（日大獣医）

地域	動物種	サンプル数
Bati近郊	ラクダ	21
	ヤギ	12
	ヒツジ	20
	ウシ	8
	ロバ	2
Jijiga近郊	ラクダ	17
	ウシ	7
	ヤギ	8
合計	ラクダ	38
	ウシ	15
	ヤギ	20
	ヒツジ	20
	ロバ	2
		95



放牧地を共有。夜になって放牧地から連れて帰り家畜ごとに収容。

# エチオピアのヒトコブラクダ血清

## HI結果

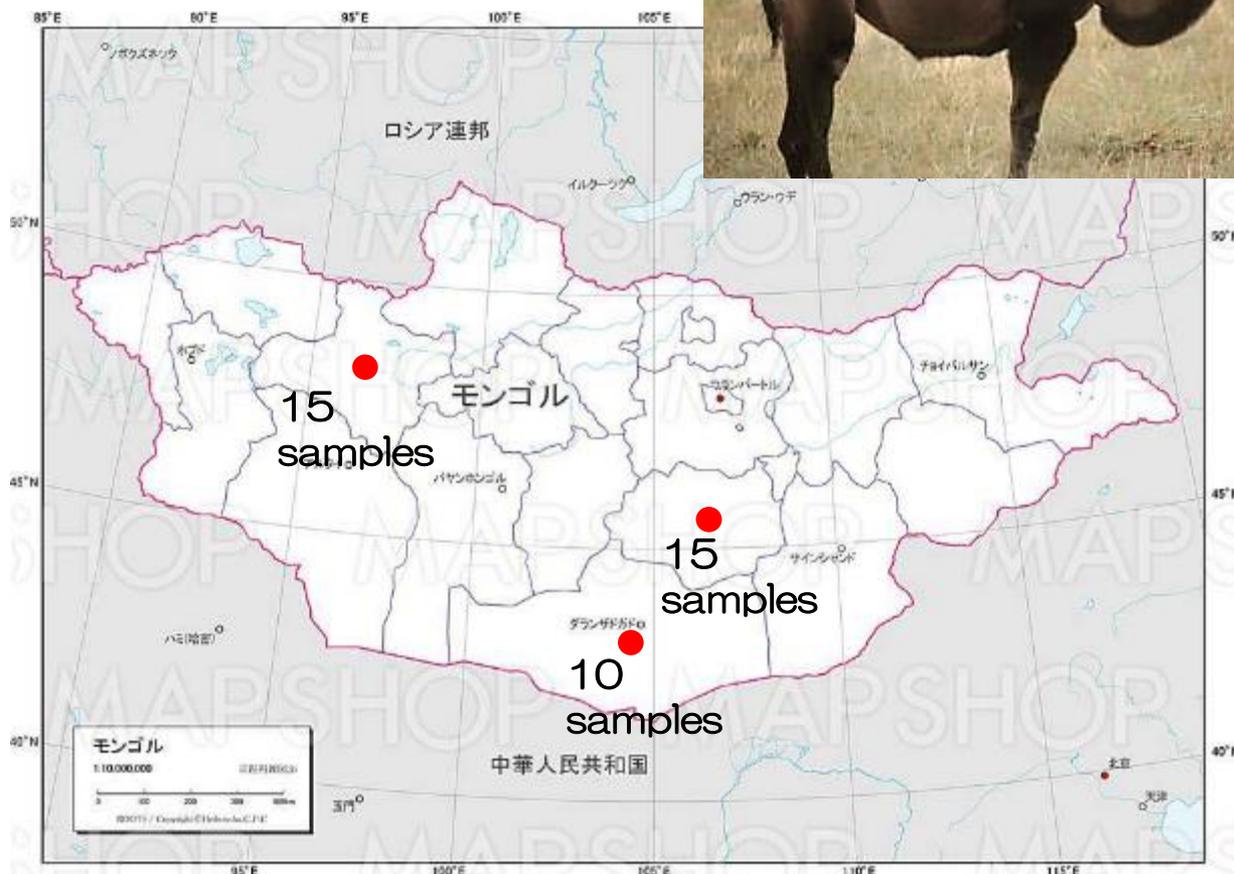
地域	動物種	陽性数（陽性率%）
Bati近郊	ラクダ	19/21 (90.5)
	ヤギ	1/12 (8.3)
	ヒツジ	0/20 (0)
	ウシ	0/8 (0)
	ロバ	0/2 (0)
Jijiga近郊	ラクダ	3/17 (17.6)
	ウシ	0/7 (0)
	ヤギ	0/8 (0)
合計	ラクダ	22/38 (57.9)
	ヤギ	1/20 (5.0)
	ヒツジ	0/20 (0)
	ウシ	0/15 (0)
	ロバ	0/2 (0)

# モンゴルのフタコブラクダ血清

## HI結果

40検体全て陰性 (<40)

ラクダは草原で放牧。所有者はゲルに居住し家畜とともに移動。夜になっても放牧したまま。



## まとめ

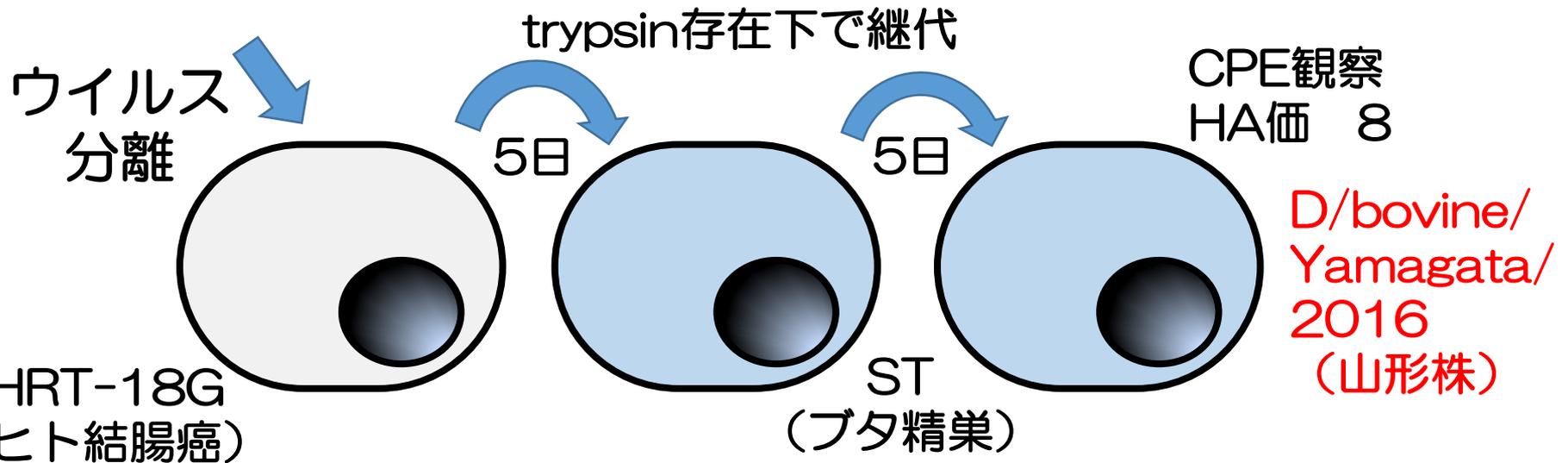
- 国内においてFluDによる牛の呼吸器疾患を初めて検出した。
- FluDはすでに全国的にウシ社会に侵淫している。
- FluDの自然宿主は東アフリカのヒトコブラクダである？

# ウシFlu Dの分離と性状解析

- 呼吸器症状牛の鼻腔検体（山形）

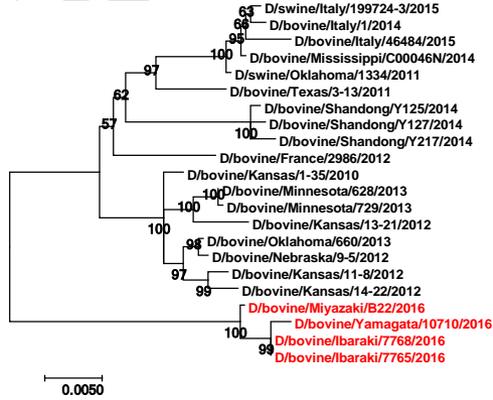


牧場	月齢	性別	Flu D (RT-PCR)
A	14	♀	陽性
A	14	♀	陽性

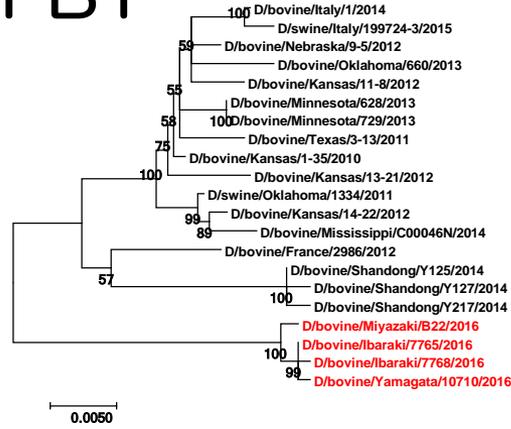


# 日本株の系統樹解析

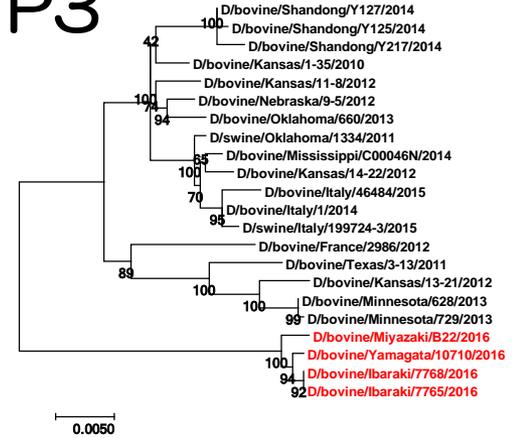
PB2



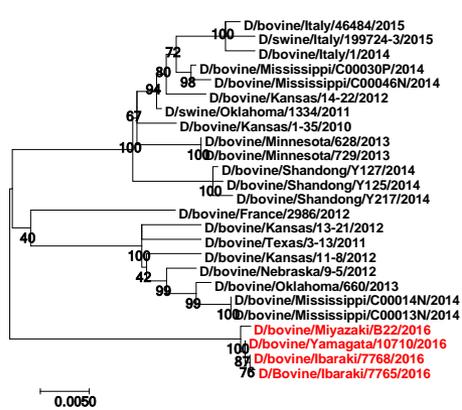
PB1



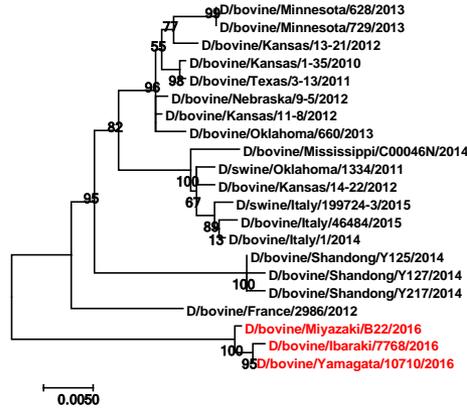
P3



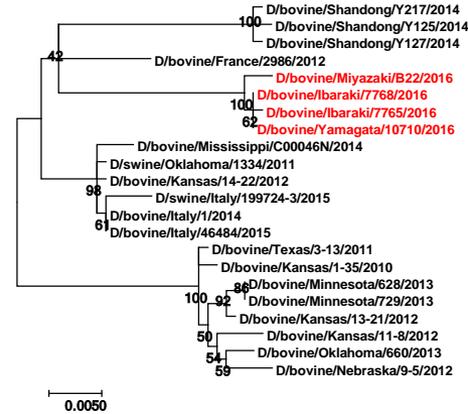
HEF



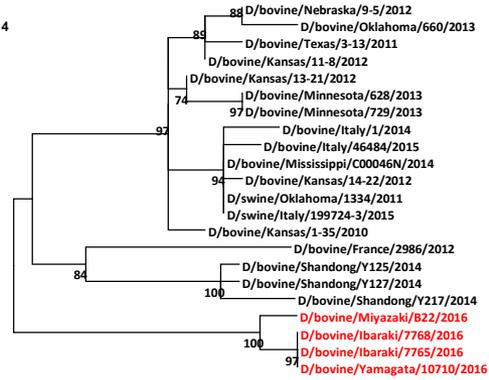
NP

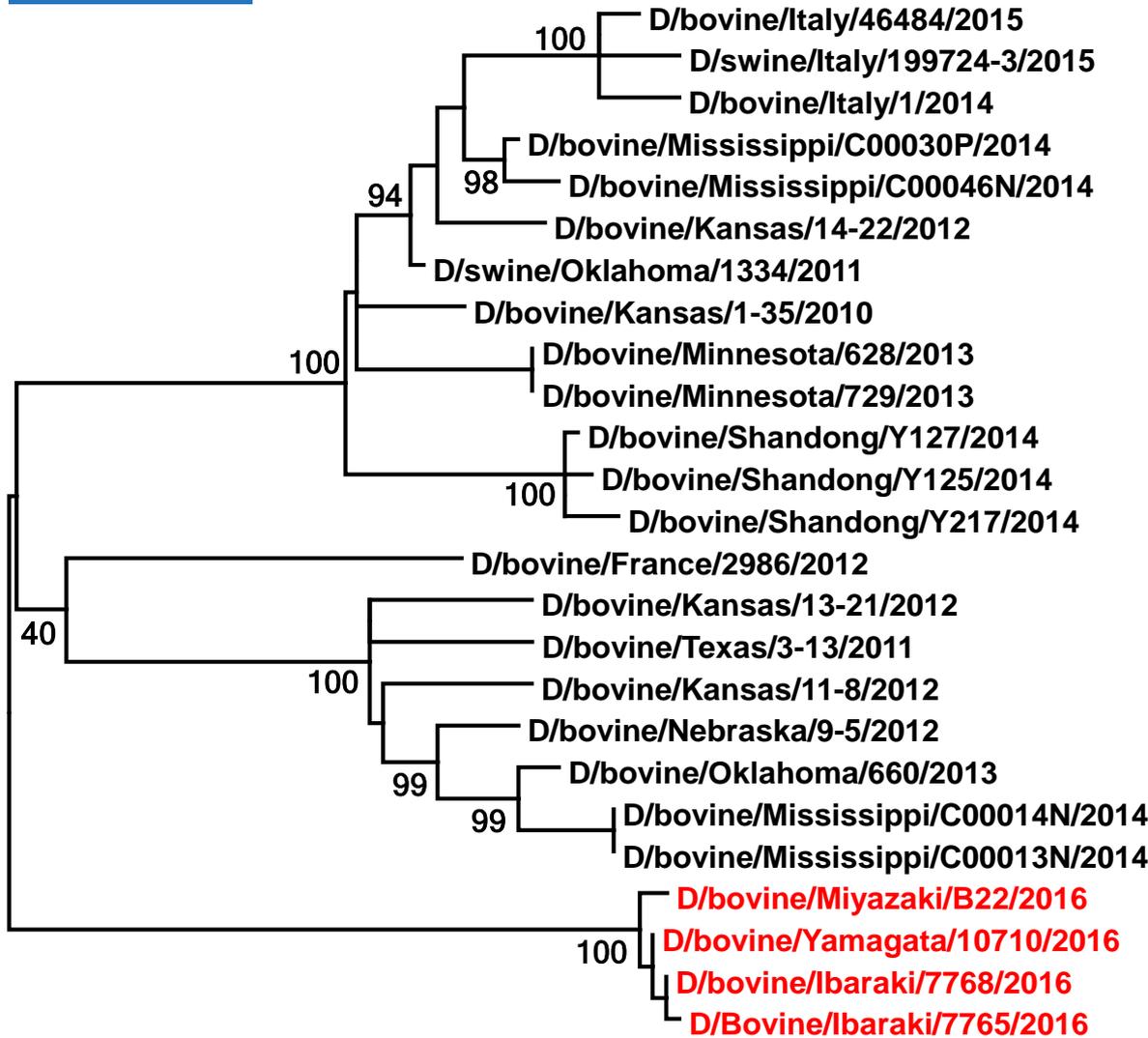


M



NS





伊

米1

中

仏

米2

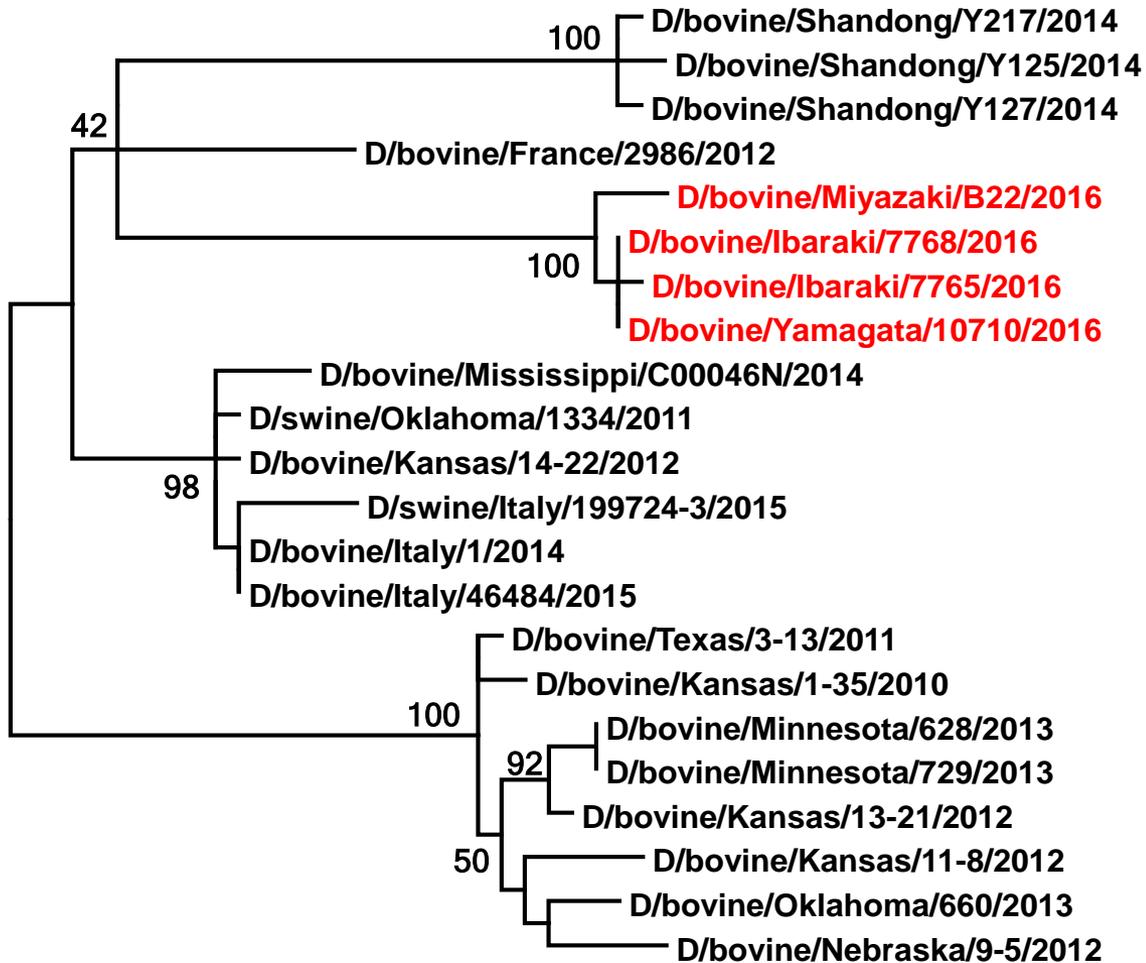
日

OK  
系統

660  
系統

日本  
系統

0.0050



0.0050

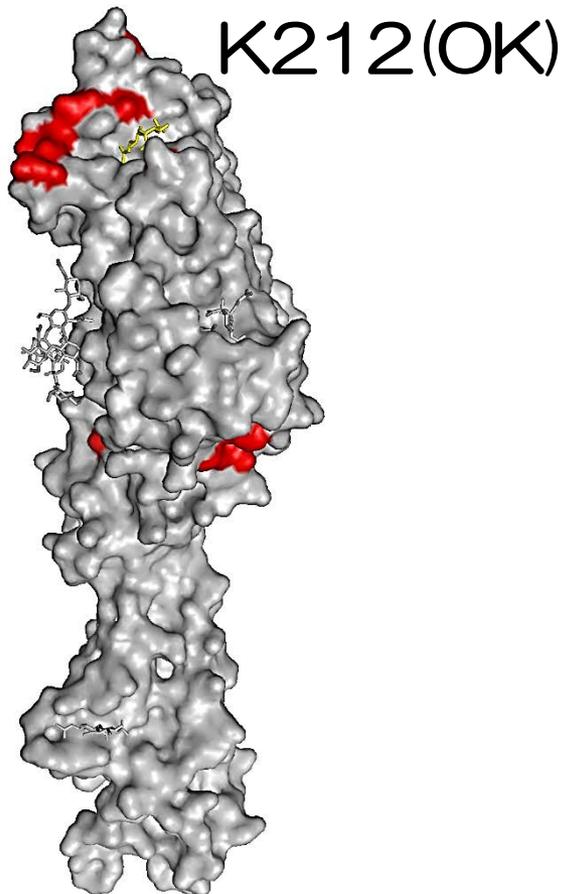


# ホモロジー 山形株 vs. 米国OK株

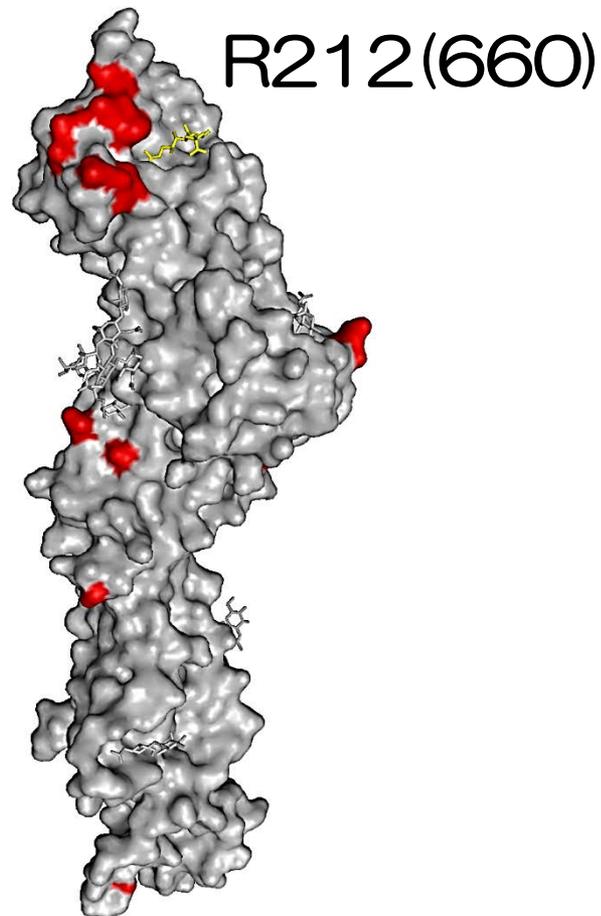
分節	塩基	アミノ酸
PB2	96%	98%
PB1	96%	98%
P3	96%	96%
HEF	96%	95%
NP	95%	96%
M	97%	97%
NS	96%	96%
日本株間	99.5~99.8%	99.6~100%

# HEFの系統間で異なるアミノ酸部位

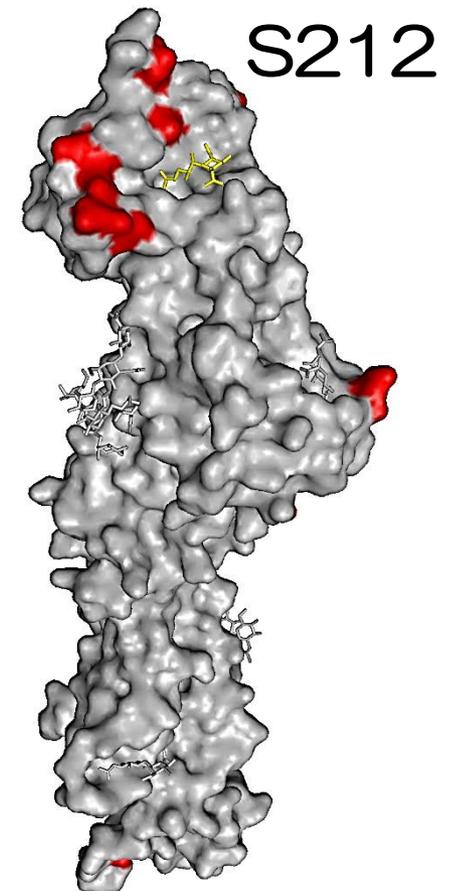
OK系統  
vs.  
日本系統



OK系統  
vs.  
660系統



日本系統  
vs.  
660系統



# 単クローン性抗体のHI反応性

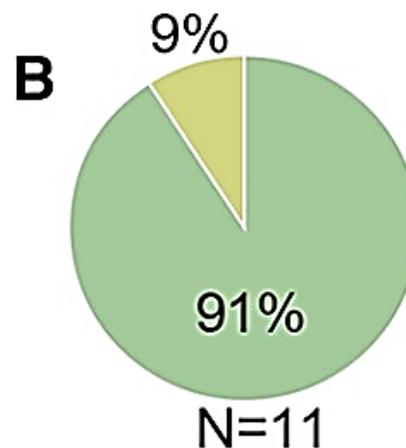
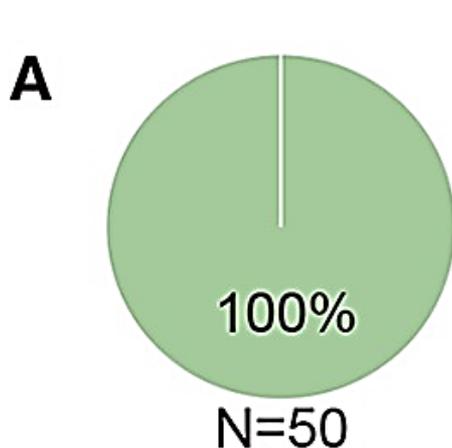
クローン	ウイルス		
	山形株	OK株	660株
B4	6,400	1,600	6,400
B13	<100	<100	<100
R36	12,800	25,600	6,400
G22	3,200	100	<100
G27	2,040,800	<100	<100
G74	400	<100	200

## まとめ

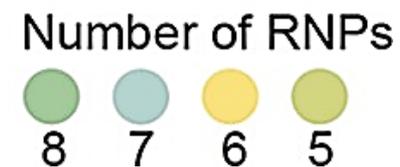
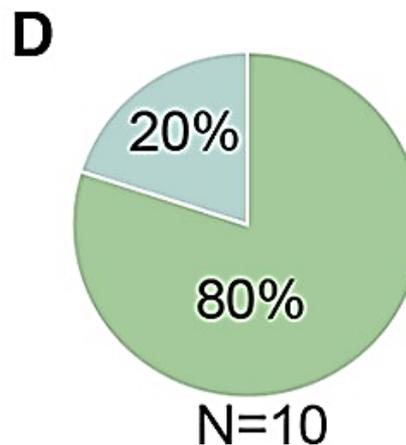
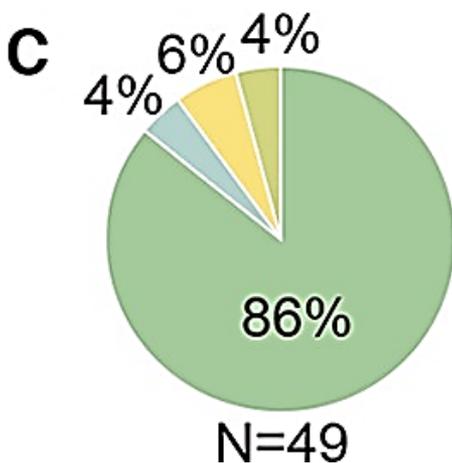
- FluD 日本株（山形株）を分離した。
- 日本株は外国株と系統的に異なり、国内で独自に進化した。
- 日本株は外国株とHEF抗原性が異なる。
- HEF抗原には共通エピトープと系統特異エピトープがある。

# インフルエンザウイルス粒子内のRNP数

A型



B型



# 人工的に作製した 7分節A型ウイルスのRNP数

8 vRNAs

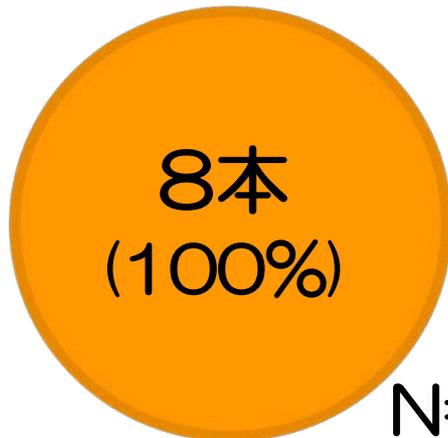


7 vRNAs



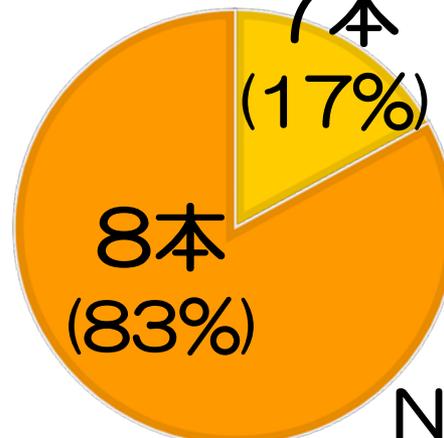
HA分節  
欠損

8本  
(100%)



N=11

7本  
(17%)  
8本  
(83%)

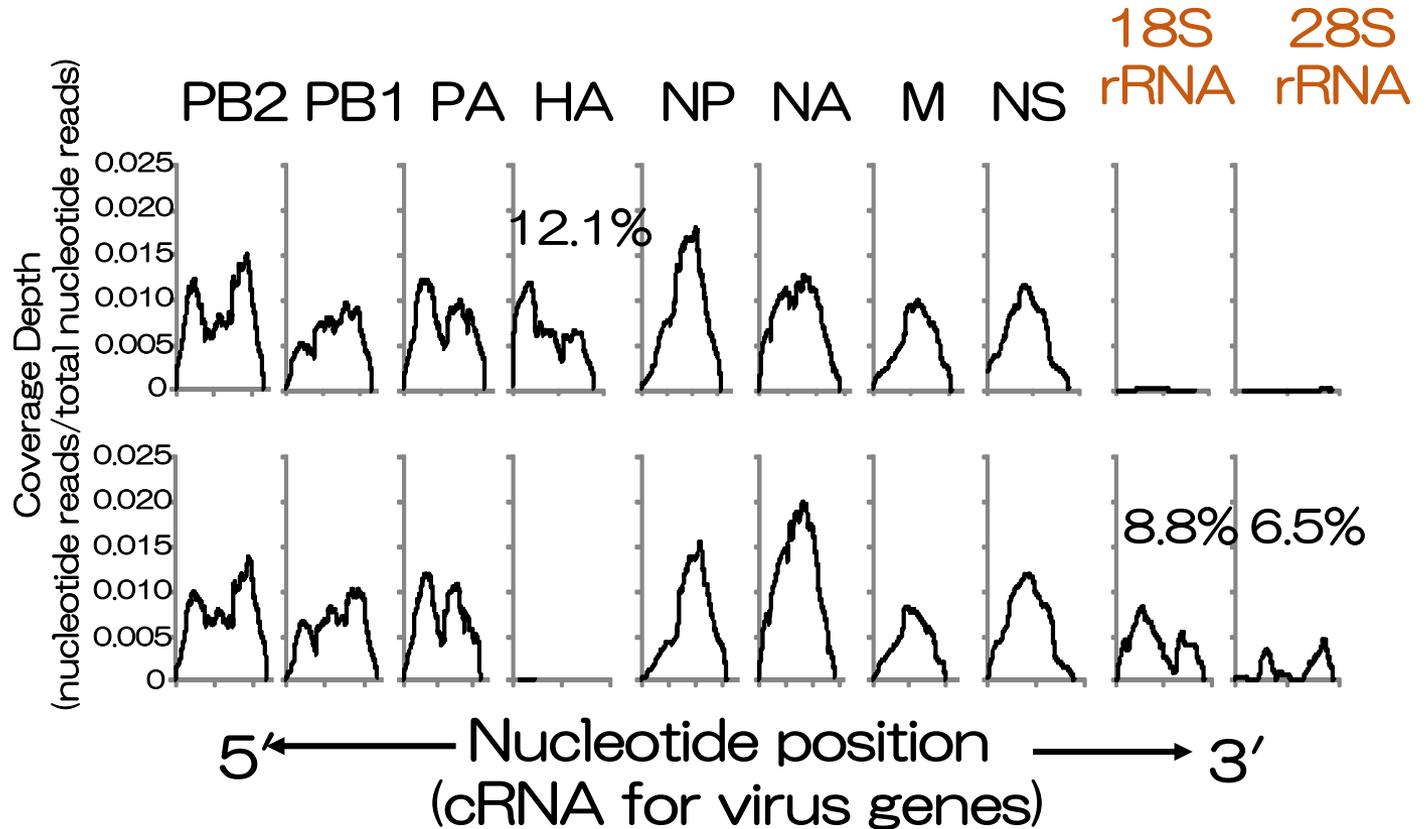


N=12

# HA(-)ウイルス粒子内のRNAの解析

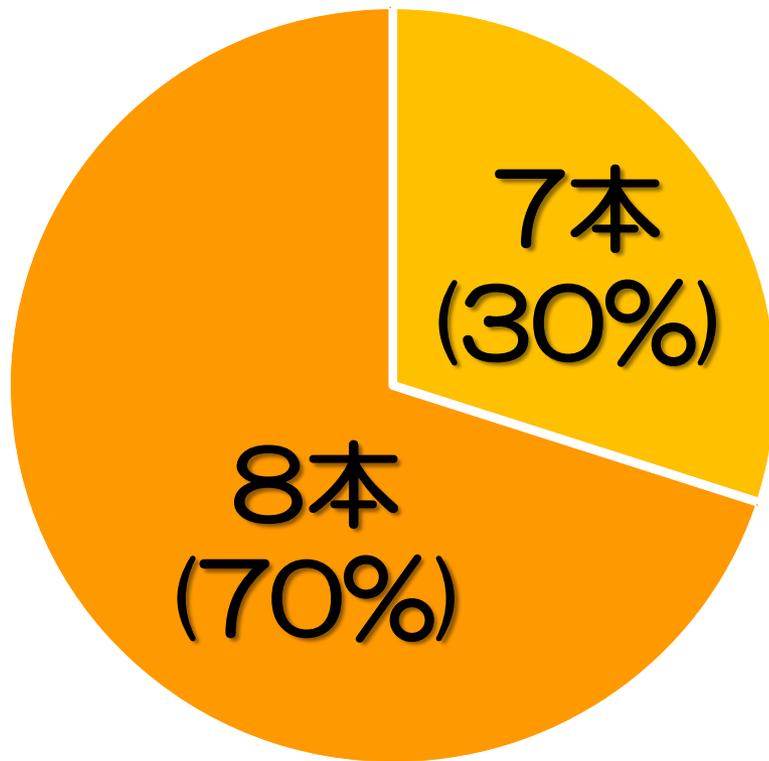
野生型  
ウイルス

HA(-)  
ウイルス

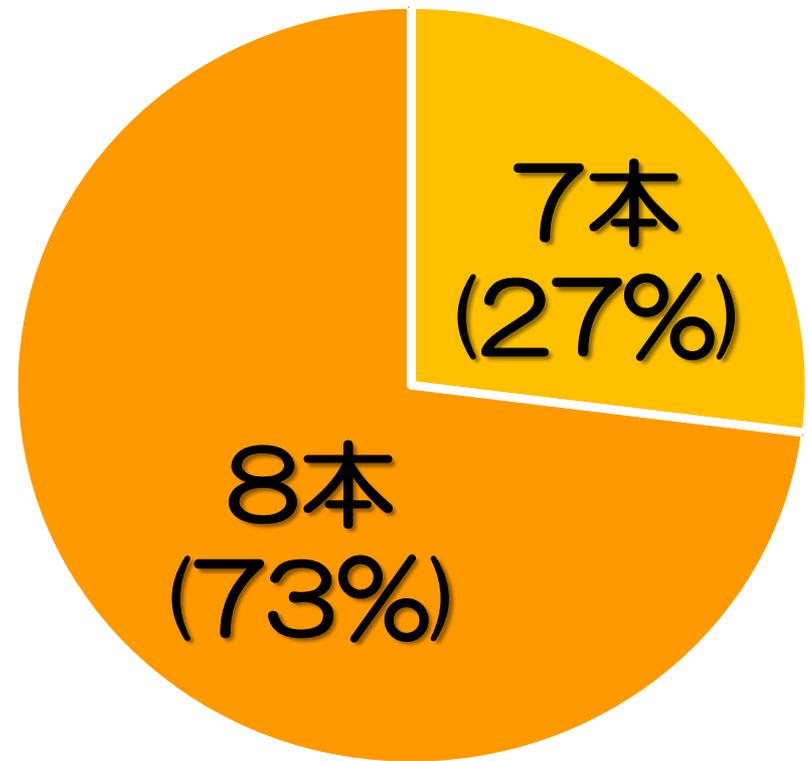


# 7分節のC型, D型ウイルスでは？

C型ウイルス



D型ウイルス



## まとめ

- ゲノム分節数にかかわらずインフルエンザウイルスは8本のRNPを取り込んでいる。
- ゲノムパッケージングの際に宿主RNAを利用する可能性がある。
- 8本のRNPが“1+7”に配置することが効率のよいゲノムパッケージングに重要と考えられる。

# Acknowledgment

カンザス大	Ben Hause
北大	日尾野隆大、迫田義博
宮大	目堅博久、乗峰潤三
岩大	彦野弘一、村上賢二
岐大	猪島康雄
鹿大	安藤貴朗、乙丸孝之介、小澤真
麻大	佐藤礼一郎、村上裕信、阪口雅弘
岩医大	村木靖
大阪府開業	石井一功
日生研	大森崇司、田積晃浩、平修
鳥取県	増田恒幸
京大ウ再研	野田岳志
東大医科研	河岡義裕
東大農	小田切友葉、石田大歩、遠藤麻衣子、 上間亜希子、小林知也、村上晋