

[技術資料]

## 平成 18 及び 19 年度に収集したニューカッスル病 ウイルスの性状調査

中村成幸、堀内隆史<sup>1</sup>、嶋崎洋子、渡辺有美

(平成21年1月30日受付、平成21年3月6日受理)

[ TECHNICAL REPORT ]

### Characterization of Newcastle Disease Virus isolated in Japan in 2006 and 2007

Shigeyuki NAKAMURA, Takashi HORIUCHI<sup>1</sup>, Yoko SHIMAZAKI and Yumi WATANABE

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries  
1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan*

(Received: 30th January 2009; Accepted: 6th March 2009)

Two strains of Newcastle disease (ND) virus isolated from chickens in Fukuoka prefecture in 2006 and one strain from a pigeon in Niigata prefecture in 2007 were investigated. The antigenicity of the isolates was determined by the hemagglutination inhibition (HI) test using antiserum against a ND live vaccine strain or a strain for ND inactivated vaccine. Three isolates were tested for pathogenicity by calculating the mean death time after inoculating them to embryonated eggs. Plaque formation on chicken embryo fibroblast cell cultures was compared with those of the ND live vaccine strains.

Three isolates showed a similar antigenicity to the vaccine strains. Pathogenicity of the two isolates from the chickens was mesogenic and the isolate from the pigeon was lentogenic. Clear plaque formation was observed in three isolates whereas no plaque was observed in the ND live vaccine strains.

These observations suggest that the ND vaccine currently used in Japan is efficacious against these three isolates and has a different plaque formation property compared to the ND live vaccine strains.

平成 18 年に鶏から分離されたニューカッスル病 (ND) ウイルス 2 株と平成 19 年にハトから分離された ND ウイルス 1 株について、ワクチン株に対する免疫血清を用いた赤血球凝集抑制試験により分離株の抗原性を調べたところワクチン株と同様であった。分離 3 株を発育鶏卵へ接種後、鶏胚の平均致死時間から病原性を調べると共に、鶏胚初代細胞におけるブラック形成能を調べた。平均致死時間から鶏由来の 2 株は中等毒、ハト由来株は弱毒に分類され、3 株とも鶏胚初代細胞に明瞭なブラックを形成した。以上のことから、分離 3 株に対し現行ワクチン株の有効性が示唆されると共に生ワクチン株とは性状が異なることが示唆された。

---

1 神奈川県横浜市役所  
City of Yokohama, Kanagawa prefecture

## 緒言

ニューカッスル病（ND）は、パラミクソウイルス科に属する ND ウイルスを原因とする急性感染症で、発症鳥は、緑色下痢、奇声や開口呼吸などの呼吸器症状、脚麻痺や頸部捻転などの神経症状、産卵低下などを示す。ND ウイルスは、鶏をはじめ多種の鳥類に感染性を持ち、ウイルスの伝播は早く、ND は日齢に関係なく発生し、法定伝染病に指定されている（鶏病研究会編 1995）。

ND の予防には、弱毒生ワクチン及び不活化ワクチンが使用され、近年大規模な発生は見られなくなった（農林水産省消費・安全局 2005）。

当所で実施している「動物用医薬品の事故防止・被害対策対応業務」では、変異や変遷等の指標となる微生物を全国の家畜保健衛生所から計画的に収集し、各種性状試験等を実施し、これらの基礎データを集積、解析することにより、現行ワクチンの有効性評価の一助としている。平成18年及び平成19年度は、ニューカッスル病ウイルスを調査対象とし、収集した野外分離株について、性状調査を行ったので、その結果を報告する。

## 材料及び方法

### （1）供試ウイルス

本調査には、Table 1 に示したとおり 2006 年 5 月に福岡県で鶏の病性鑑定材料から分離された ND ウイルス 2 株及び

2007 年 7 月に新潟県でハトの病性鑑定材料から分離された ND ウイルス 1 株の合計 3 株を供試した。ND に対するワクチン歴は、H18A-3 株が分離された鶏群に対し分離 1 年前に ND 生ワクチンの飲水投与が行われていた。その他の群では、ND ワクチンは使用されていなかった。

既知の対照 ND ウイルスとして、Clone30、MET95、B1、VG/GA 2/23/88 の各弱毒生ワクチン株、強毒株の対照として佐藤株を用いた。

各ウイルス株を 10 日齢の日生研 SPF 鶏群由来発育鶏卵に接種し得られた尿膜腔液を  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存し、各試験に用いた。

### （2）血清学的性状

赤血球凝集抑制（HI）試験により供試株の血清学的性状を調べた。

既知の免疫血清は、ワクチン株である ND ウイルス B1 株及び不活化した石井株を日生研 SPF 鶏群由来鶏に免疫し、作製した。

HI 試験は、市販抗原（（財）化学及血清療法研究所「ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素」）を用い、その使用説明書に従って試験を実施した。

### （3）発育鶏卵接種試験

分離株の病原性を知る目的で発育鶏卵接種試験を行った。

卵に分離株を PBS で 10 倍階段希釈し、1 希釈当たり 5 個の尿膜腔内に 0.1ml ずつ日生研 SPF 鶏群由来 10 日齢発育鶏

Table 1. List of Newcastle Disease virus isolates

Name of isolate	Prefecture of isolation	Date of isolation	Isolated from	ND Vaccination
H18A-3	Fukuoka	May 2006	Chicken Trachea, Rectum	Yes (live vaccine) May 2005
H18A-4	Fukuoka	May 2006	Chicken Trachea, Rectum	No
JP/Niigata-pg/07	Niigata	July 2007	Pigeon Rectum	No

## H18 及び 19 年度 PL 収集 ND ウイルスの性状調査

接種し、37℃で培養した。8時間後同様に接種し、37℃で培養した。観察は1日2回、7日間行い鶏胚の死亡時間を記録し、最小致死量における鶏胚平均致死時間 (MDT) を求めた。

## (4) プラック形成能

生ワクチン株と野外株の識別のため鶏胚初代 (CE) 細胞におけるプラック形成能について調べた。

動物用生物学的製剤基準 (農林水産省 2008) ND 生ワクチンのマーカー試験法を準用した。なお、プラック形成の陽性対照として、鶏腎初代 (CK) 細胞も用いた。

## 実験成績

## (1) 血清学的性状

野外分離3株は、抗 B1 株及び抗石井株免疫血清と同様に反応し、3株とも各ワクチン株との血清学的な抗原性に差異は認められなかった (Table 2)。

## (2) 鶏胚平均致死時間

Table 3 に示すように H18A-3 株及び H18A-4 株の MDT は 60 時間から 90 時間の間で中等毒、JP/Niigata-pg/07 株の MDT は 90 時間を超え弱毒に分類された。弱毒の対照として用いた生ワクチン株の MDT はすべて 90 時間を超え弱毒、強毒の対照株である佐藤株のそれは 60 時間未満で強毒に分類された。

Table 2. HI test of Newcastle Disease virus isolates

Antigen	Antisera	
	B1	Ishii
H18A-3	1,280	640
H18A-4	1,280	640
JP/Niigata-pg/07	1,280	640
B1	2,560	640
Ishii	5,120	1,280

Table 3. Velogenicity of isolates from time taken to kill chick embryos

Sample	MDI(hr)	Virulence	Remarks
H18A-3	70.6	mesogenic	
H18A-4	68	mesogenic	
JP/Niigata-pg/07	128.6	lentogenic	
Clone 30	95.8	lentogenic	live vaccine
MET95	118	lentogenic	live vaccine
B1	97.8	lentogenic	live vaccine
Sato	56	velogenic	velogenic strain

MDI, Mean Death Time

## (3) プラック形成能

分離株及び既知の ND ウイルス株は、すべて CK 細胞において、プラックを形成した。

一方、生ワクチン株は、すべて CE 細胞でプラックを形成しなかったが、分離3株及び佐藤株は明瞭なプラックを形成した (Table 4)。

Table 4. Plaque formation of isolates in CE and CK cells

Sample	CE cells	CK cells
H18A-3	+	+
H18A-4	+	+
JP/Niigata-pg/07	+	+
VG/GA 2/23/88	-	+
Clone 30	-	+
MET95	-	+
B1	-	+
Sato	+	+

## 考察

鶏由来2株及びハト由来1株の ND ウイルスについて、抗原性、病原性及び生ワクチン株との関係を知るため性状を調査した。生ワクチンの製造用株である B1 株及び不活化ワクチンの製造用株である石井株に対する免疫血清を用い野外分離3株を抗原として HI 試験を行ったが抗原的な差異は認められなかった。

鳥類のパラミクソウイルスは、9種の血清型が知られており、NDウイルスは1型に属しており、NDウイルスの血清型は単一である（鶏病研究会編 1995）。HI試験の結果、野外分離3株は、ワクチン株の免疫血清と交差したことから、現行のワクチン株が有効な免疫を賦与できると考えられた。

H18A-3株が分離された鶏群には、1年前にND生ワクチンの飲水投与が行われている。そこで、生ワクチン株との関係を明らかにする目的で生ワクチン株との病原性の比較及びワクチンマーカー保有の有無を知るため、発育鶏卵接種試験及びCE細胞におけるブラック形成能を調べた。MDTの結果からH18A-3株及びH18A-4株は中等毒に分類され、CE細胞でブラックを形成したことから生ワクチン株とは異なることが明らかとなった。一方、JP/Niigata-pg/07株はMDTから弱毒に分類されたが、CE細胞でブラックを形成したことから生ワクチン株とは異なると判断された。JP/Niigata-pg/07株は、水様性下痢、嘔吐等の症状が見られた2～4か月齢のレース用若ハトから分離されたウイルスであり、ハトには病原性があるが鶏に対する病原性は不明である。

NDは、依然として散発的に発生し、養鶏産業にとって重要な伝染病である。家畜伝染病予防法上NDは、鶏、あひる、七面鳥及びうずらが対象動物であり、ハトは対象外であるため、たとえハトのNDが発生しても家畜伝染病予防法のND発生にはならない。今回、鶏及びハトから分離されたNDウイルスを用いたが、NDウイルスは多種類の鳥類に感染性があるため、国内には広くNDウイルスが存在する可能性がある。防除対策を講ずる必要がある。

NDの予防は、日頃の衛生管理とワクチン接種が重要である。近年、ワクチン非接種愛玩鶏やワクチン歴のあるブロイラーや採卵鶏のND発生がある（鶏病研究会 2001）。H18A-3株が分離された鶏群は、1年前に生ワクチンの飲水投与が行われていた。基本的なND予防のワクチン接種プログラムは、1～4、14及び28日齢時に生ワクチンを接種し、60日齢以降に生又は不活化ワクチンでブースター後更に

2～3か月毎にブースター注射を繰り返すこととされている（鶏病研究会 2006）。従って、今回のケースは、生ワクチンが使用されていたがワクチンによる免疫が低下した時期に野外感染を受けたものと思われた。ワクチンの使用時は、ワクチンの適正使用に加え、特に生ワクチンは移行抗体のレベルや投与方法によるばらつきを考慮したワクチン接種を行い、確実に免疫を賦与することが大切である（岩本ら 2004）。また、ワクチン接種群でもNDが発生していることから、鶏だけでなく鳥類由来NDウイルスの抗原性の変異等について引き続き調査し、現行ワクチンの有効性を確認することが重要であると思われた。

### 謝辞

本試験の実施にあたり野外分離株を送付していただいた福岡県及び新潟県の関係者に深謝いたします。

また、貴重な情報を提供していただいた新潟県中央家畜保健衛生所会田恒彦氏に深謝いたします。

### 引用文献

- 鶏病研究会編（1995）鳥の病気． pp.10-13  
 鶏病研究会 東京  
 農林水産省消費・安全局（2005）平成 15 年家畜衛生統計． pp.24-25 平成 17 年 6 月  
 農林水産省（2008）動物用生物学的製剤． pp.476-479 平成 20 年 3 月  
 鶏病研究会（2001）ニューカッスル病の防除対策． 鶏病研究会 報 37, 149-159  
 鶏病研究会（2006）総合ワクチンテーションプログラム． 鶏病研究会報 42, 1-9  
 岩本聖子、嶋崎洋子、山崎芙美、吉永麻希子、野牛一弘（2004）鶏種、投与時期、投与方法と国内ニューカッスル病生ワクチン株の免疫応答に関する検討 動物医薬品検査所年報 41, 45-50