

令和2年3月30日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：3007

鳥インフルエンザにおける大腸菌等複合感染の影響の検証

研究期間：平成30年度～令和元年度（2年間）

研究総括者名：常國 良太

試験研究機関名：鶏複合感染鳥フル診断コンソーシアム

- ・ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
- ・ 国立大学法人鳥取大学

1 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の患畜及び疑似患畜の診断は、「高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」に従い、全国の家畜保健衛生所が簡易検査及び遺伝子検査により行っている。平成 30 年 1 月に香川県で HPAI が発生した際には、検査の陽性率や遺伝子の検出率の低さのため、診断に時間を要することとなった。一方で、本事例では死亡した鶏において大腸菌症の所見がみられていることから、大腸菌症と HPAI の併発が疑われている。

大腸菌、ブドウ球菌及びマイコプラズマ等の複合感染は、鳥インフルエンザウイルス (AIV) の家きんへの病原性や増殖に影響を与えることが分かっている。鶏での H9N2 亜型の AIV と大腸菌との複合感染においては、感染後の臨床症状及びウイルス排泄が、ウイルスの単独感染と比較して増強することが報告されている (Br. Poult. Sci., 2018, 59;160-165; Iran J. Vet. Res., 2017, 18;86-91)。HPAI ウイルス (HPAIV) については感染実験による検証は報告されていないが、AIV の報告と同様に、大腸菌感染によって症状が重篤化することが予想される一方で、ウイルス量についてはウイルスの増殖の早い段階で鶏が死亡することにより、単独感染で死亡した場合に比べて低い可能性がある。また、大腸菌の複合感染で症状の重篤化が報告されている一方で、ニューカッスル病ウイルス (NDV) との複合感染では、HPAIV による致死時間が延長することが報告されている (Vet. Res., 2015, 46;97)。ニューカッスル病 (ND) は、HPAI と同様に法定伝染病に指定されている鳥類の急性伝染病であるが、ワクチンによる予防が効果的であることから、養鶏産業では定期的なワクチンの投与が行われている。そのため、HPAI の検査時に ND 生ワクチンが残留することによって HPAI の検査に影響がある可能性がある。HPAI の診断において、死亡鶏から採取した検体のウイルス量は、検査感度に影響する最も重要な要因である。そのため、大腸菌の複合感染や ND 生ワクチンが残留する鶏の正確な診断を行うためには、これらの微生物が HPAI の検査感度に与える影響を把握する必要がある。

そこで本研究課題では、大腸菌の複合感染や ND 生ワクチンの残留が現行の防疫指針による HPAI 診断に与える影響を明らかにし、防疫指針の改正の必要性の有無の検討に資する科学的知見を提供することを目的とする。

このため、大腸菌との複合感染や ND 生ワクチンを使用した鶏への HPAIV の感染を実験により再現し、HPAI 診断に対する影響について検証を行う。これにより、大腸菌の複合感染や ND 生ワクチンの残留が現行の防疫指針による HPAI 診断に与える影響を明らかにし、防疫指針の改正の必要性の有無の検討に資する科学的知見を提供する。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題 1 : 鶏大腸菌症に係る実験モデルの構築

・小課題1：大腸菌株の収集【鳥取大学】

日本国内で発生している鶏の大腸菌症の原因菌株の細菌学的性状を把握するため、都道府県の家畜保健衛生所あるいは鶏農場において大腸菌症と診断された鶏の病変部スワブを採取し、原因菌の分離を行うとともに、発育鶏卵における病原性試験を実施する。100-300 CFU の生菌を 12 日齢の発育鶏卵（12 個）の尿膜腔内に接種し、生死を 2 日後まで観察する。Wooley らの基準に従い、30%以上の死亡率を認めた菌株を高病原性、10%未満の死亡率を認めた場合非病原性、10%～29%の死亡率を認めた菌株を中等度の病原性と判定する。また、分離菌株の細菌学的及び遺伝学的性状の解析を行う。すなわち、菌種同定キット API20E における性状、薬剤感受性並びに PCR 法による病原因子及び薬剤耐性遺伝子の保有の確認を行う。

・小課題2：大腸菌感染実験モデルの構築【鳥取大学】

鳥取大学において、大腸菌症に罹患した鶏から分離し保存している菌株を用い、接種経路及び接種力価を検討することにより、5 週齢の鶏に大腸菌症を再現するモデルを構築する。また、必要に応じて（1）で収集し、発育鶏卵における病原性試験により選択した大腸菌をモデル構築に供する。

感染モデルの構築には、平成 30 年 1 月に香川県で高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）が発生した際の鶏の週齢を再現するため、5 週齢の鶏を用いて行う。接種経路については、すでに 10 日齢の鶏において大腸菌症様の症状及び大腸菌に特徴的な心膜炎及び肝被膜炎が確認されている気嚢内接種について、検討を行う。感染鶏の症状を観察するとともに、死亡した鶏については、剖検所見の収集および HPAI の診断材料の採材部位である気管及び総排泄腔スワブ中の大腸菌の力価を測定する。

2) 中課題2：鳥インフルエンザの検査への大腸菌との複合感染等の影響の検証

・小課題1：ニューカッスル病等の生ワクチンが鳥インフルエンザの感染や検査に与える影響の検証【農研機構 動物衛生研究部門】

ND、鶏伝染性気管支炎ウイルス、鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスおよび鶏ニューモウイルス生ワクチンを、HPAIV 香川株と混合し、検査材料へ生ワクチンが混入した場合の HPAI の検査感度への影響を検証する。（当初計画に無かったが、第 1 回推進会議の意見に従い *in vitro* の実験を追加した。）

4 週齢の鶏に ND 生ワクチンを投与し、ND 生ワクチンと同時または 3 日後に 10⁶ EID₅₀ の HPAIV 香川株で攻撃する。攻撃後の鶏の症状の観察および病変部の記録を行うとともに、死亡した鶏の気管及び総排泄腔スワブを採取する。採取したスワブ検体を用いて HPAI の検査を行い、香川株単独感染との比較を行う。

市販の ND 生ワクチンにおいて、点眼、噴霧、散霧及び飲水による投与方法が認可されているが、本課題では個体間のばらつきを抑えるため、点眼による投与を行

う。国内で認可されている ND 生ワクチンは、B1 株または B1 株と近縁な株を使用していることから (<http://www.maff.go.jp/nval/kijyun/pdf/SV10300.PDF>)、本課題では B1 株を用いて検証を行う。HPAI の検査は、家畜保健衛生所が HPAI の疑似患畜の判定の際と同様に、簡易検査キット、H5 及び NP 遺伝子に対するコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR を用いて行う。検体中の NDV 及び香川株それぞれのウイルス力価は、NDV 及び香川株に対する抗血清を用いることにより測定し、単独感染との比較により、ND 生ワクチンを使用した場合における鶏からの HPAIV の排泄量、検査材料への ND 生ワクチン混入の有無及び混入した場合の HPAI の検査感度への影響を検証する。

- ・小課題 2：大腸菌感染鶏における鳥インフルエンザ複合感染モデル・評価系の構築
【農研機構 動物衛生研究部門】

中課題 1 の小課題 2 で構築した大腸菌感染実験モデルを元に、大腸菌を感染させた 5 週齢の鶏に、 10^6 EID₅₀ の香川株で攻撃する。香川株で攻撃する時期は、大腸菌と同時に接種するものを含め少なくとも 2 種類の時期について検証する。

- ・小課題 3：大腸菌感染が鳥インフルエンザの病態（感染率、死亡率、症状等）や検査（簡易検査及び遺伝子検査）に与える影響の検証
【農研機構 動物衛生研究部門】

中課題 2 の小課題 2 で構築した大腸菌と HPAIV の複合感染モデルを用いて感染実験を行い、症状を観察するとともに死亡した鶏の気管及び総排泄腔スワブを採取する。採取したスワブ検体を用いて HPAI の検査を行い、香川株単独感染との比較を行う。HPAI の検査は、簡易検査キット、H5 及び NP 遺伝子に対するコンベンショナル及びリアルタイム RT-PCR を用いて行う。単独感染との比較により、大腸菌が複合感染した場合における鶏からの HPAIV の排泄量への影響を検証する。また、剖検所見を収集し、スワブ検体中の大腸菌の力価を測定することにより、検査材料への大腸菌の混入の有無を調べ、混入が認められた場合には、大腸菌の混入が HPAI の検査感度へ及ぼす影響について検証する。また、*in vitro* において大腸菌を HPAIV 香川株と混合し、検査材料へ生ワクチンが混入した場合の HPAI の検査感度への影響を検証する。（当初計画に無かったが、第 1 回推進会議の意見に従い *in vitro* の実験を追加した。）

(2) 年次計画

項目	平成30年度	令和元年度
1. 鶏大腸菌症に係る実験モデルの構築		
(1) 大腸菌株の収集	大腸菌症由来株の収集および性状解析 (鳥取大学)	
(2) 大腸菌感染実験モデルの構築	大腸菌症の感染実験モデルの構築 (鳥取大学)	
2. 鳥インフルエンザの検査への大腸菌との複合感染等の影響の検証		
(1) ニューカッスル病等の生ワクチンが鳥インフルエンザの感染や検査に与える影響の検証	生ワクチンと HPAIV の複合感染時における HPAI 検査の評価 (動物衛生研究部門)	
(2) 大腸菌感染鶏における鳥インフルエンザ複合感染モデル・評価系の構築	大腸菌と高病原性鳥インフルエンザウイルスの複合感染モデルの構築 (動物衛生研究部門)	
(3) 大腸菌感染が鳥インフルエンザの病態 (感染率、死亡率、症状等) や検査 (簡易検査及び遺伝子検査) に与える影響の検証	大腸菌と HPAIV の複合感染時における HPAI 検査の評価 (動物衛生研究部門)	
所要経費 (合計)	2,256千円	3,633千円

中課題1の小課題2「大腸菌感染実験モデルの構築」について、平成30年度で終了する予定であったが、小課題1「大腸菌株の収集」により大腸菌症を発症する菌の特性に多様性があることが明らかとなったため、モデル構築に使用する菌株を慎重に選択する必要性がでてきたため、令和元年度も実施することとなった。

中課題2の小課題1「ニューカッスル病等の生ワクチンが鳥インフルエンザの感染や検査に与える影響の検証」について、平成30年度で終了する予定であったが、第一回推進会の意見による *in vitro* の実験の追加および国内唯一の SPF 鶏販売メーカーからの SPF 鶏の供給停止による感染実験の遅延のため、令和元年度も実施することとなった。

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	動物衛生研究部門	常國 良太	30
1. 鶏大腸菌症に係る実験モデルの構築	鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター	○ 村瀬 敏之	10
(1) 大腸菌株の収集		△ 村瀬 敏之	前出
(2) 大腸菌感染実験モデルの構築		△ 尾崎 弘一	10
2. 鳥インフルエンザの検査への大腸菌との複合感染等の影響の検証	動物衛生研究部門	○ 常國 良太	前出
		谷川 太一朗	20
		内田 裕子	5
		(平成30年11月～)	
		竹前 喜洋	5
		(平成30年11月～)	
		峯 淳貴	5
		(平成30年11月～)	
		中山 ももこ	5
		(平成30年11月～)	
(1) ニューカッスル病等の生ワクチンが鳥インフルエンザの感染や検査に与える影響の検証		△ 常國 良太	前出
		谷川 太一朗	前出
		内田 裕子	前出
		(平成30年11月～)	
		竹前 喜洋	前出
		(平成30年11月～平成31年3月)	
		峯 淳貴	前出
		(平成30年11月～)	
		中山 ももこ	前出
		(平成30年11月～)	
(2) 大腸菌感染鶏における鳥インフルエンザ複合感染モデル・評価系の構築		△ 常國 良太	前出
		谷川 太一朗	前出
		内田 裕子	前出
		(平成30年11月～)	

(3) 大腸菌感染が鳥インフルエンザの病態（感染率、死亡率、症状等）や検査（簡易検査及び遺伝子検査）に与える影響の検証		竹前 喜洋 （平成30年 11月～平成 31年3月）	前出
		峯 淳貴 （平成30年 11月～）	前出
		中山 ももこ （平成30年 11月～）	前出
	△	常國 良太	前出
		谷川 太一朗	前出
		内田 裕子 （平成30年 11月～）	前出
		竹前 喜洋 （平成30年 11月～平成 31年3月）	前出
		峯 淳貴 （平成30年 11月～）	前出
		中山 ももこ （平成30年 11月～）	前出

3 研究推進会議の開催状況

別紙の（1）のとおり

4 研究成果の概要

(1) 主要な成果

ア 成果の内容（別紙の（2）参照）

（ア）大腸菌感染が現行の遺伝子検査法へ与える影響

令和元年度に改訂となった新しい遺伝子検査法によって、大腸菌感染の有無に関わらず、HPAIVに感染して死亡した鶏から HPAI 診断が可能であることが確認された。平成30年度までの遺伝子検査法では、ウイルス力価の低い検体からの検出率が低いことから、改訂された新しい遺伝子検査法の有効性が確認された（p25）。

（イ）大腸菌感染モデルの構築

鶏大腸菌由来株を5週齢の鶏の気嚢内に接種することにより、鶏大腸菌症の感染モデルの構築に成功した。本課題の HPAIV との複合感染だけでなく、構築された大腸菌感染モデルにより、大腸菌株の違いによる病原性の比較や、HPAIV 以外の病原体との複合感染の影響を調べる等の研究が可能となる（p13）。

イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

なし

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題1 (鶏大腸菌症に係る実験モデルの構築) の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①大腸菌症を罹患した鶏の検体収集および大腸菌の分離を行い、分離した大腸菌の性状を解析する (小課題1 関連)。(平成30年度)
↓
②大腸菌の菌株、接種経路および投与量を検討することにより、鶏の大腸菌感染モデルを構築する (小課題2 関連)。(平成30年度、令和元年度)
↓
③引き続き、大腸菌罹患鶏からの大腸菌の分離および性状解析を行い、国内の大腸菌症原因株の特徴を明らかにする (小課題1 関連)。(令和元年度)
成果目標：国内の大腸菌症発生菌株の性状を明らかにし、大腸菌対策を推進する際の科学的知見を提供。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①および③】

平成30年1月にHPAIが発生した香川県の農場において、同年9月及び10月に発生した大腸菌症由来株の分与を受けた。その内訳は、9月の事例の3羽由来7株及び10月の事例の4羽由来19株で、気管下部、肺、心臓、肝臓、脾臓又は腎臓由来株であった。9月の事例由来株のPFGEパターンが同一であった。10月の事例由来株のPFGEパターンは同一であったが、9月の事例由来株と異なっていた(図1)。(平成30年度)

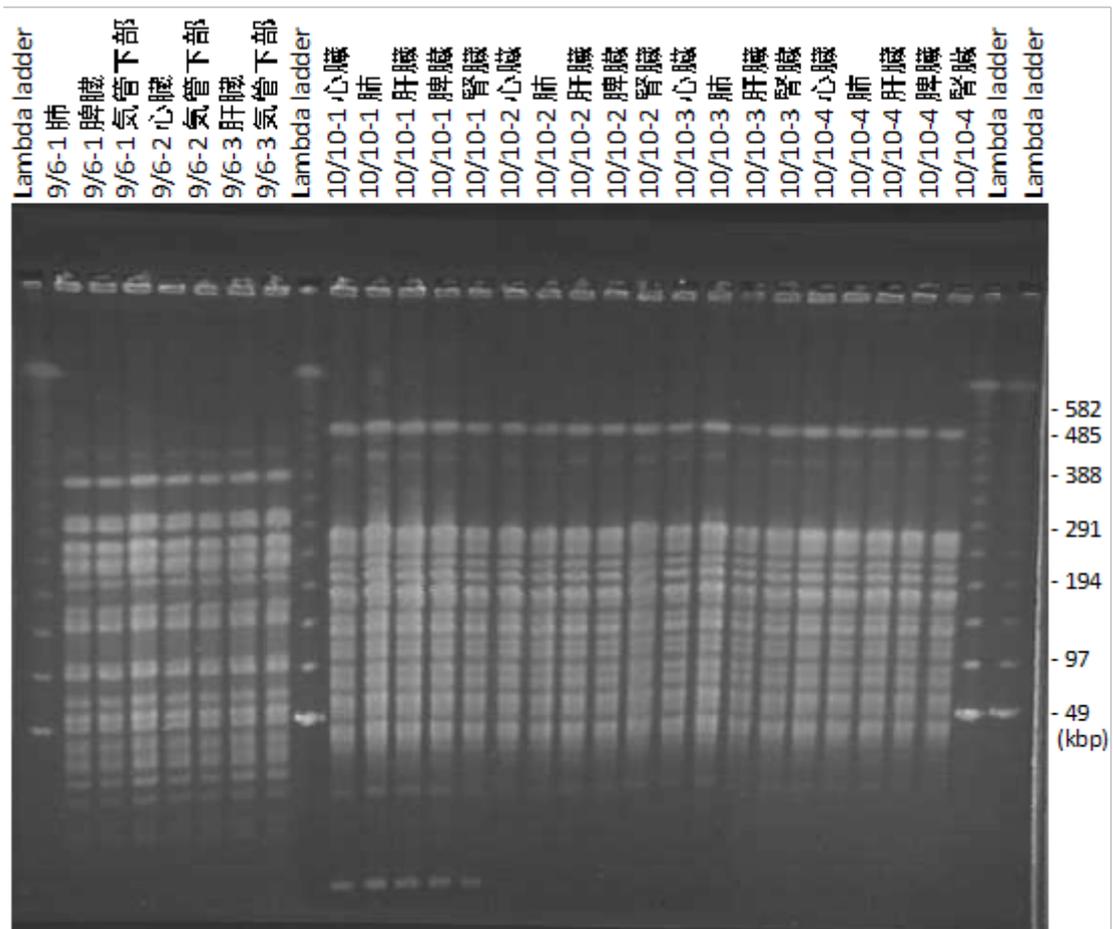


図 1. 香川県の大腸菌症罹患鶏由来株 (B) の PFGE パターン

また、家畜保健衛生所 7 箇所から検体採取用資材提供の依頼があり、平成 30 年 11 月までに 3 箇所から病変部スワブ 157 検体が送付された。大腸菌が純培養状に発育した検体から菌株を分離した。分離菌株の PFGE 解析を行い、同一パターンを示す株のうち 1 株を代表株として無作為に選抜し、PFGE パターンが互いに異なる 40 株を、分離菌株の発育鶏卵における病原性試験、血清型別、系統関係に基づく遺伝子型別、病原性関連遺伝子の解析及び薬剤感受性試験に供することとした。(平成 30 年度、令和元年度)

香川県より分与された菌株について、9 月の事例由来 6 株及び 10 月の事例由来 8 株を用いて発育鶏卵における病原性試験を実施した。12 日齢の発育鶏卵 12 個の尿膜腔内に各菌株を 100~300 CFU 接種し、48 時間後の死亡数を計測した。Wooley ら (2000) の基準に基づき、死亡率 30% (死亡卵 4 個) 以上を病原性株とした。各菌株について 2 回接種実験を実施し、2 回とも 30%以上の死亡率を認めた菌株は、9 月の事例由来 6 株のうち 1 株であったが、10 月の事例由来 8 株はすべてであった (表 1)。(平成 30 年度)

表 1. 香川県の大腸菌症罹患鶏由来株を接種した発育鶏卵における
48 時間後の鶏胚死亡数

菌株 番号	鶏个体 番号	由来 臓器	接種 48 時間後死亡数	
			実験 1	実験 2
D2848	9/6-1	肺	4	2
D2849	9/6-1	脾臓	2	2
D2851	9/6-2	心臓	5	3
D2852	9/6-2	気管	5	3
D2853	9/6-3	肝臓	2	4
D2854	9/6-3	気管	9	4
D2855	10/10-1	心臓	8	6
D2856	10/10-1	肺	6	11
D2860	10/10-2	心臓	6	5
D2861	10/10-2	肺	7	8
D2865	10/10-3	心臓	8	7
D2866	10/10-3	肺	9	6
D2869	10/10-4	心臓	6	5
D2870	10/10-4	肺	10	10
D137*	罹患鶏	肝臓	4	6
21034**	健康鶏	糞便	1	0
PBS***	n. a.	n. a.	0	0

*病原性株 (Ozaki ら、2018)

** 非病原性株 (Ozaki ら、2018)

*** リン酸緩衝生理食塩水

血清型別の結果、O 抗原又は H 抗原が特定できたのは 11 株のみであった (表 2)。(平成 30 年度、令和元年度)

表 2. 分離菌株の血清型

血清型*	株数
O6:H16	4
O6:HUT	1
O15:H18	1
O18:H7	2
O25:H4	1
OUT:H4	1
OUT:H21	1 (香川県 9 月分離株を含む)
OUT:HUT	31 (香川県 10 月分離株を含む)

*UT, untypeable (型別不能)

香川県由来 D2848 及び D2870 株 (大腸菌感染実験モデルに供試した株) 並びに家畜保健衛生所から提供された検体由来の 40 株を発育鶏卵に接種し病原性を判定した。同じ実験を 2 度実施し、病原性及び非病原性と判定された株が各 19 株で (図 2)、実験ごとに判定結果が異なる株が 4 株であった。

病原性関連遺伝子を、(i) 莢膜 (*kpsM II*)、(ii) 血清抵抗性 (*iss*)、(iii) 毒素 (*tsh*)、(iv) アドヘジン (*sfa*, *foc*, *papA*, *papC*, *papEF*) 及び (v) 鉄獲得 (*iutA*, *fyuA*) の 5 つのカテゴリーに区分し、保有する遺伝子のカテゴリーの数で表し、鶏卵への病原性と比較した。発育鶏卵において病原性と判定された菌株の 95% (18/19) は遺伝子のカテゴリー数が 3 以上であった。これに対し、発育鶏卵において非病原性と判定された菌株の 68% (13/19) はカテゴリー数が 2 以下であった (図 2)。

系統関係に基づく遺伝子型別の結果、7 つの遺伝子型 (Clermont ら、2013) に型別された。phylogroup B2 と型別された 5 株のうち 4 株が、また、B1 と判定された 10 株のうち 8 株が、それぞれ発育鶏卵において病原性と判定された。phylogroup B2 の菌株には血清型 O25:H4 及び O18:H7 が含まれた。一方、phylogroup A の 8 株のうち 6 株が非病原性と判定された。phylogroup F のうち 4 株は病原性、6 株は非病原性と判定された。

香川県由来 D2848 株は phylogroup B1、D2870 株は C であり、いずれの株とも発育鶏卵において病原性と判定され、保有する病原性関連遺伝子のカテゴリー数は 3 であった。(平成 30 年度、令和元年度)

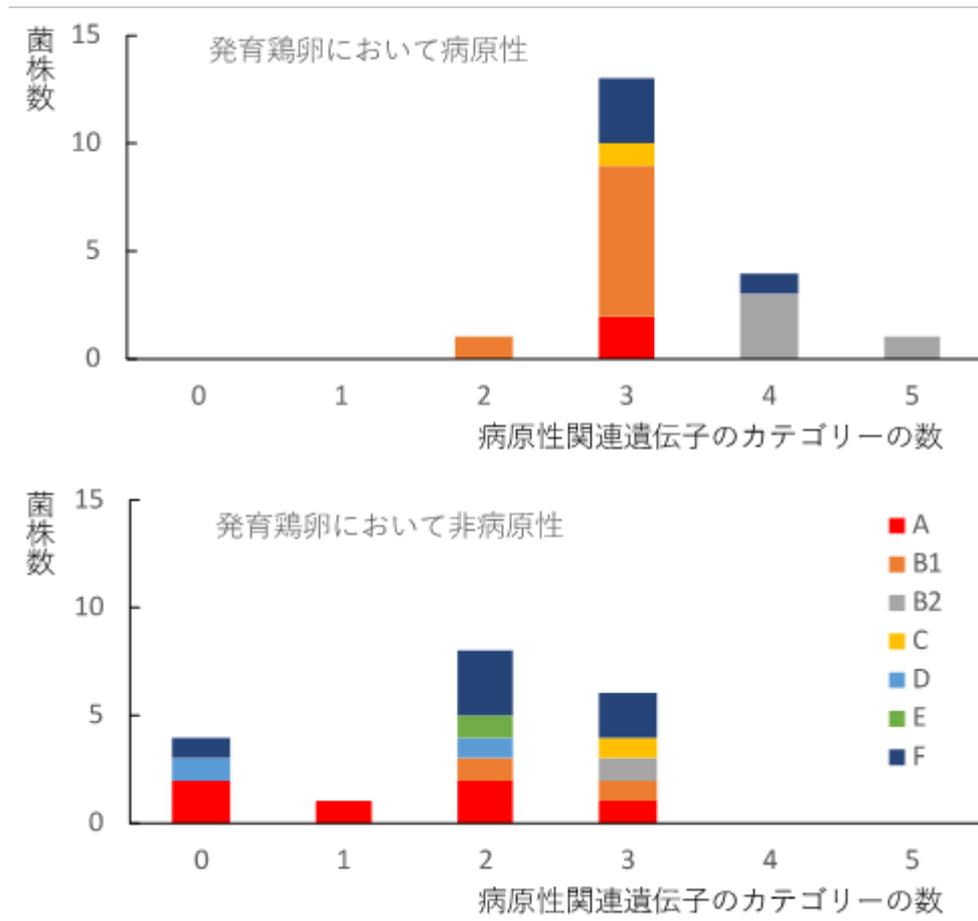


図2. 供試株の発育鶏卵における病原性、病原性関連遺伝子の保有及び系統関係に基づく遺伝子型別

寒天希釈法により 13 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を調査した (表 3)。アンピシリン (AMP)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、カナマイシン (KAN)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CHL)、ナリジクス酸 (NAL) 及びスルフィソキサゾール (SUL) に耐性を示す株が 54.8~83.3%であった。ゲンタマイシン (GEN) 及びコリスチン (CL) に耐性を示す株はなかった。香川県由来 9 月分離株は全てセフトオフル耐性であった (表 3 は、D2848 株のみを反映)。セフトオフル耐性を付与する遺伝子として AmpC 型 β ラクタマーゼが検出された。(令和元年度)

表 3. 供試株における最小発育阻止濃度 (MIC) の測定と耐性株の割合

薬剤名*	耐性限界値 ($\mu\text{g/ml}$)**	MIC ($\mu\text{g/ml}$) の範囲	MIC50***	MIC90***	耐性株の 割合 (%)
AMP	32	2 - >512	256	512	54.8
CEZ	32	0.25 - 512	1	4	2.4
CTF	8	<0.13 - 16	0.25	0.5	2.4
DSM	32	4 - >512	512	>512	69.0
GEN	16	1 - 2	1	2	0
KAN	64	4 - >512	>512	>512	83.3
OTC	16	1 - 512	256	512	64.3
CHL	32	4 - >512	256	>512	76.2
CL	4	0.25 - 0.5	0.25	0.25	0
NAL	32	2 - >512	128	>512	66.7
ERFX	2	<0.13 - 64	0.5	32	33.3
SUL	>512	<32 - >512	>512	>512	69.0
TMP	16	0.25 - >512	2	>512	38.1

*AMP, アンピシリン; CEZ, セファゾリン; CFT, セフチオフル; DSM, ジヒドロストレプトマイシン; GEN, ゲンタマイシン; KAN, カナマイシン; OTC, オキシテトラサイクリン; CHL, クロラムフェニコール; CL, コリスチン; NAL, ナリジクス酸; ERFX, エンロフロキサシン; SUL, スルフィソキサゾール; TMP, トリメトプリム

**CL 以外は Clinical Laboratory Standards Institute, CL は The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing に準じた

***供試株の 50% 及び 90% の菌株の発育を阻止する抗菌薬の濃度

【工程表の②】

大腸菌症罹患鶏由来株 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) として香川県より分与された菌株のうち、発育鶏卵接種試験で高い死亡率を認めた 10 月の事例由来株である D2870 株 (phylogroup C、病原性関連遺伝子数 3) 及び当研究室で保存している採卵鶏由来 D137 株 (phylogroup F、病原性関連遺伝子数 5) 及び健康な肉用鶏糞便由来株 21034 株を用いた。接種菌株あたり 5 週齢の鶏 5 羽を宛て、アイソレーター各 1 室で 5 羽を飼養した。(平成 30 年度)

接種後の臨床症状を数値化するため臨床スコアを設定し、元気消失又は食欲減退を 1、元気消失及び食欲減退を 2、立毛・起立不能を 3、死亡を 4 とした。接種 2 日後に、D2870 接種鶏のうち 2 羽の臨床症状が著しく悪化し、そのうち 1 羽は死亡した (図 3)。また、D137 接種鶏のうち 2 羽が他の 3 羽に比べ一般状態が悪化した (図 4)。21034 接種鶏はなんら症状を示さなかった。そこで、一般状態が悪化した APEC 接種鶏の計

3羽及び D2870 接種鶏のうち死亡した 1羽に加え、対照として 21034 接種鶏 2羽を安楽殺し、剖検に供した。引き続き、接種 11 日後まで観察した各群 3羽では、D2870 接種鶏では 5 日後まで元気の消失が認められた。D137 接種鶏は 3 日後以降臨床症状を認めなかった。(平成 30 年度)

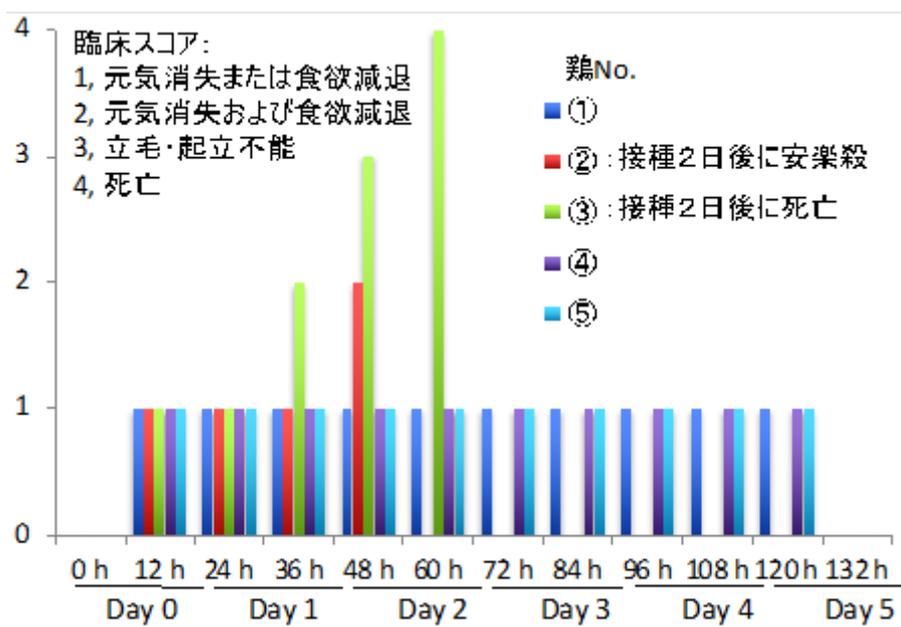


図 3. APEC D2870 接種鶏における臨床スコアの推移

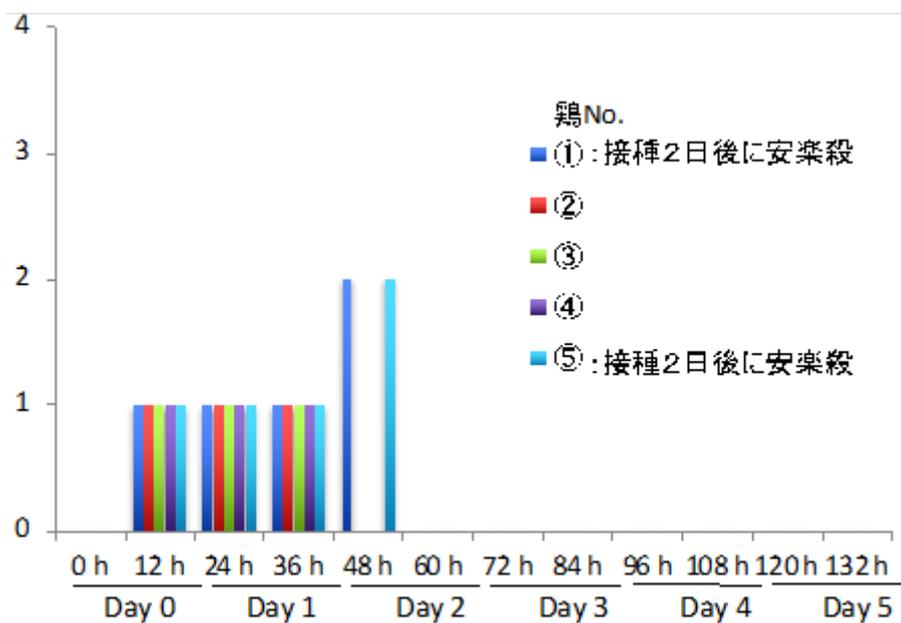


図 4. APEC D137 接種鶏における臨床スコアの推移

大腸菌接種後の体重は、D2870 接種群では、11 日間観察した 3 羽のうち 2 羽において 7 日後に 12-18% 減少したがその後増加に転じた（図 5）。D137 接種群では 2 日後までに最大 11% の減少を認めたが、その後徐々に増加した。他の 1 羽は 6 日後まで体重の増減を認めず、その後増加した。21034 接種鶏はいずれも特記すべき臨床症状を認めなかったが、1 羽において 4 日後までに体重の減少を認めた。（平成 30 年度）

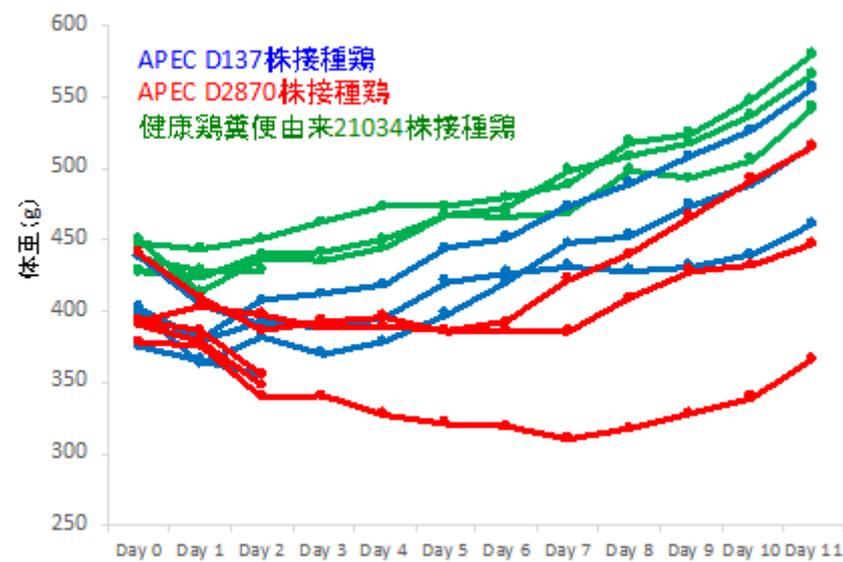


図 5. 接種後の体重の推移

D2870 接種 1～3 日後（図 6）、また、D137 接種 1～2 日後（図 7）に採取した血液より接種菌株と同一の PFGE 像を示す菌が分離され、最大で 10^4 CFU/ml を越えた。21034 接種鶏の血液からは大腸菌は検出されなかった。（平成 30 年度、令和元年度）

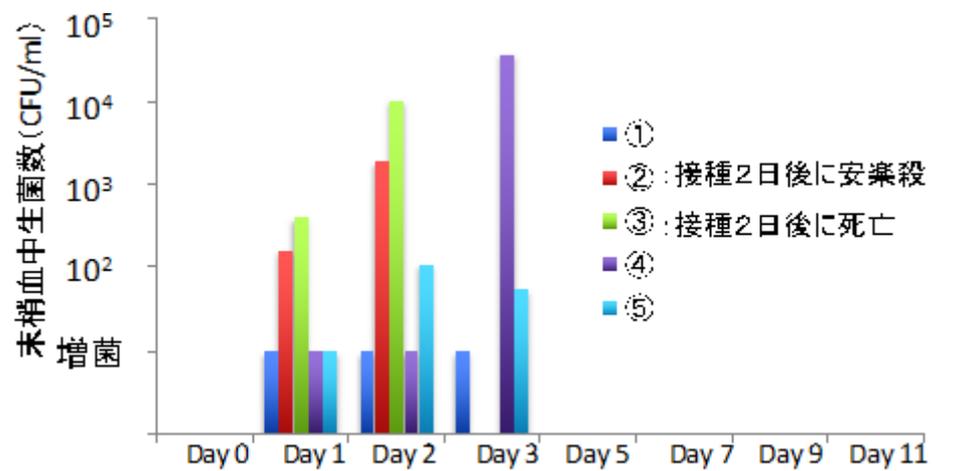


図 6. D2870 接種鶏における末梢血中生菌数

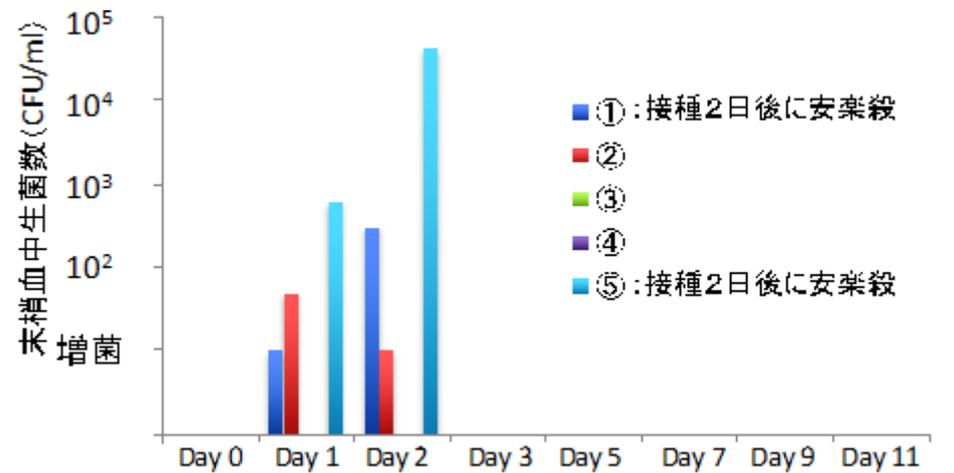


図7. D137 接種鶏における末梢血中生菌数

気管スワブのうち、D2870 接種 2～7 日後に 5 羽すべてから (図 8)、D137 接種 2 日後に 4 羽から (図 9)、また、D2870 接種 2 日後に 1 羽から (図 10) 接種菌株と同一の PFGE 像を示す菌が分離されたが、口腔内細菌と考えられる菌も同時に分離された。(平成 30 年度、令和元年度)

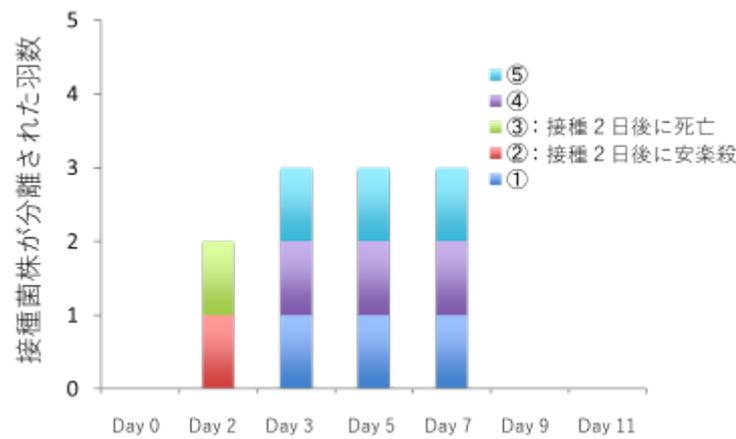


図8. D2870 接種鶏気管スワブからの菌分離

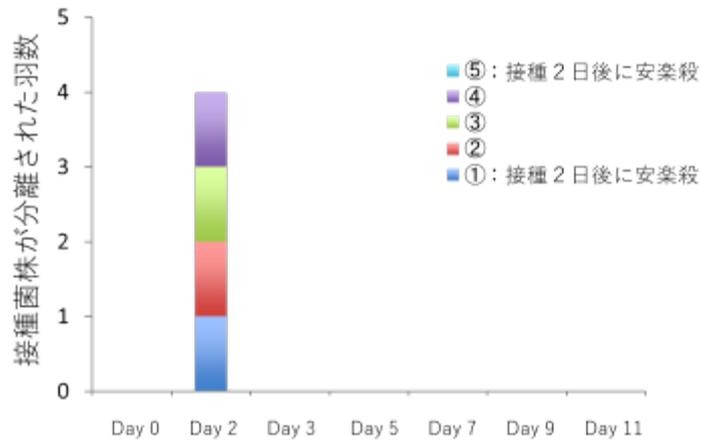


図9. D137 接種鶏気管スワブからの菌分離

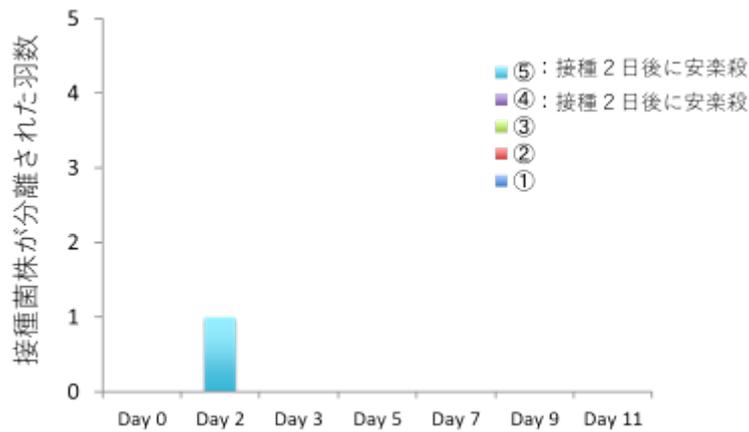


図10. 21034 接種鶏気管スワブからの菌分離

D137及びD2870接種2日及び11日後に安楽殺した鶏において心外膜炎、肝被膜炎、気嚢炎を認めたが（写真1～4）、21034 接種鶏においては病変を認めなかった（写真5）。（平成30年度）



写真1. D2870接種2日後



写真2. D137接種2日後



写真3. D137接種11日後



写真4. D2870接種11日後



写真5. 21034接種11日後

D2870 株を接種 2 日後に剖検した鶏の臓器から最大で 10^6 CFU/g、D137 株を接種 2 日後に剖検した鶏の臓器から最大で 10^5 CFU/g を越える生菌が検出されたが、接種 11 日後に剖検した鶏の臓器からは菌が分離されなかった（図 11）。21034 接種鶏の臓器からは、接種 2 日及び 11 日後ともに菌が分離されなかった。（平成 30 年度、令和元年度）

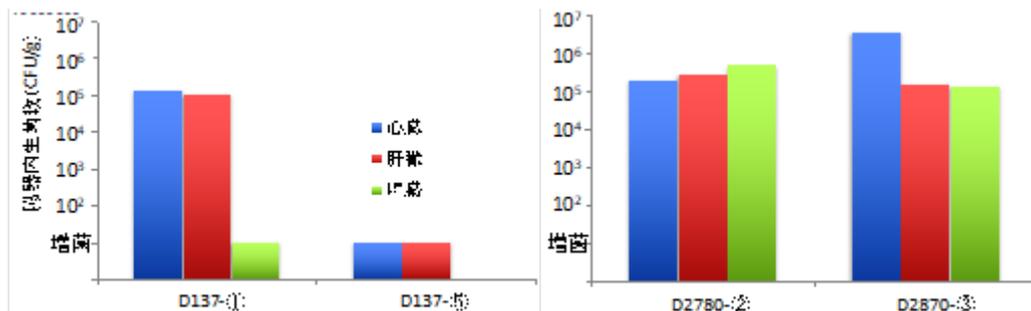


図 11. D137（左）及び D2870（右）接種 2 日後における臓器内生菌数

以上の成績より、D137 及び D2870 の気嚢内接種により大腸菌症の病変と一時的な菌血症が確認されたことから、本モデルを HPAI ウイルスとの複合感染に供することが可能と考えられた。(平成 30 年度、令和元年度)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

鶏大腸菌症由来株を 5 週齢白色レグホン鶏の気嚢内に 10^7 CFU 接種することにより、接種 2～5 日後までに体重減少、元気消失肝臓及び心臓に典型的な病変を確認し、一部の鶏は死亡した。このことから、本中課題の目標である HPAI ウイルスとの複合感染モデルに使用する鶏大腸菌症の感染実験モデルの確立は達成された。

また、国内の鶏大腸菌症由来株を収集し、血清型の判別、薬剤耐性の有無および病原性についての情報を明らかにした。

ア 中課題 2（鳥インフルエンザの検査への大腸菌との複合感染等の影響の検証）の
研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①ND 生ワクチン株と HPAIV の複合感染を感染実験により再現し、HPAI 診断時の検出率および感度を検証する（小課題 1 関連）。（平成 30 年度、令和元年度）
↓
②中課題 1 で構築した大腸菌感染モデルをもとに、大腸菌と HPAIV の複合感染モデルを構築する（小課題 2 関連）。（令和元年度）
↓
③構築した複合感染モデルをもとに、HPAI 診断時の検出率および感度を検証する（小課題 3 関連）。（令和元年度）
成果目標:大腸菌の複合感染や ND 生ワクチンの残留が現行の防疫指針による HPAI 診断に与える影響を明らかにし、防疫指針の改正の必要性の有無の検討に資する科学的知見を提供。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

2018 年に香川県で HPAI 発生を起こした HPAIV 香川株と ND 生ワクチンに使用される B1 株を 4 週齢鶏に接種した。HPAIV 単独および NDV と同時に HPAIV を接種した鶏は 4 日以内に全て死亡したのに対し、3 日前に NDV を接種した鶏に HPAIV を接種した場合、8 羽中 1 羽が生存した（図 12）。（平成 30 年度）

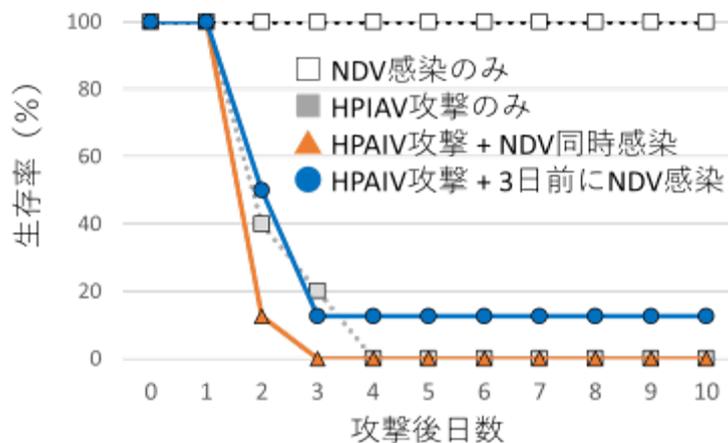


図 12. NDV と HPAIV 攻撃後の生存曲線

死亡した鶏の気管および総排泄腔からは、1本のスワブ当たりそれぞれ $10^{3.8}$ から $10^{7.2}$ EID₅₀ および $10^{1.6}$ から $10^{5.2}$ EID₅₀ の HPAIV が検出され、NDV の感染によるスワブ中の HPAIV に有意な差は認められなかった (図 13)。死亡した鶏の気管および総排泄腔スワブを用いた簡易検査では全ての鶏で陽性を示したが、簡易検査の発色の強度において、NDV 同時接種群と NDV 3 日前接種群との間で有意な差が認められた (図 13)。また、死亡した鶏の気管および総排泄腔スワブ 1 本当りに含まれる NDV は、最大でもそれぞれ 10^4 および $10^{2.7}$ EID₅₀ であった。(平成 30 年度、令和元年度)

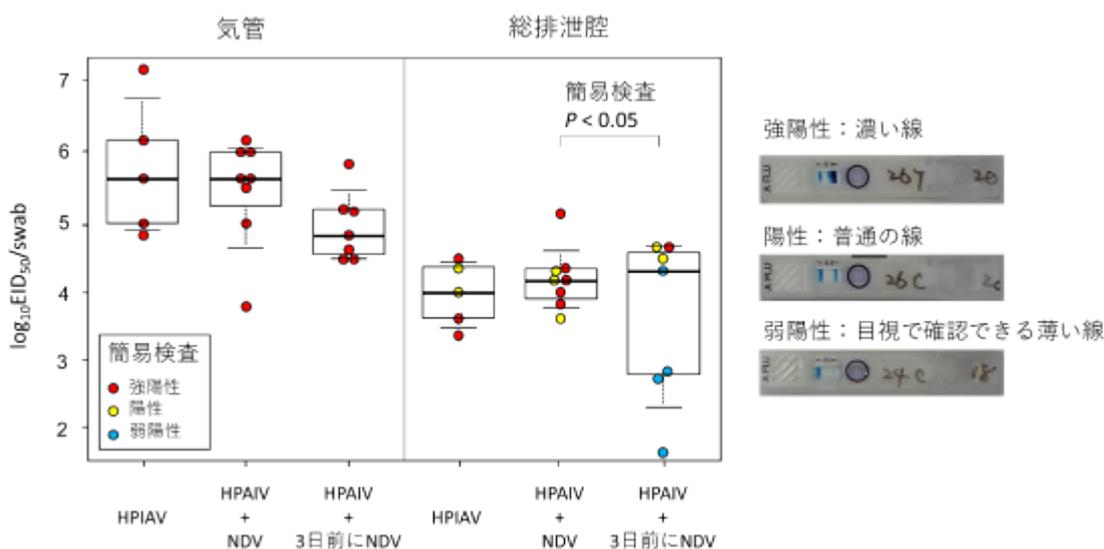


図 13. NDV と HPAIV 複合感染死亡鶏からのウイルス排泄および簡易検査

死亡した鶏のリアルタイム PCR において、令和元年度に改訂された新法を用いた場合、気管、総排泄腔スワブともに全ての鶏が A 型および H5 陽性であった。平成 30 年度までの旧法では、気管スワブからは全ての検体が A 型陽性であった。一方、H5 遺伝子の検査では、HPAIV のみ接種した鶏では全て陽性であったが、NDV を同時および 3 日前に接種した鶏では、それぞれ 50% および 43% が陽性であった。総排泄腔スワブからの A 型および H5 の検査の陽性率は、気管スワブよりも低く、それぞれ 20 から 50% および 13 から 20% であった (図 14)。(令和元年度)

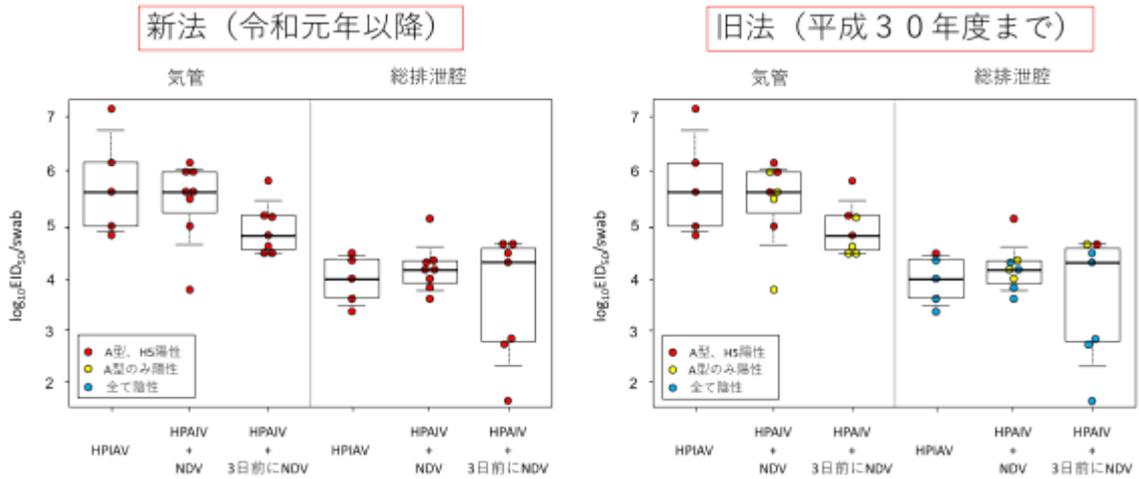


図 14. NDV と HPAIV 複合感染死亡鶏からのリアルタイム PCR 検査 (左：新法、右：旧法)

死亡した鶏のコンベンショナル PCR において、令和元年度に改訂された新法を用いた場合、気管、総排泄腔スワブともに全ての鶏が A 型および H5 陽性であった。平成 30 年度までの旧法では、全ての群において気管および総排泄腔スワブで A 型が陽性であった。H5 遺伝子の検出は、気管スワブからは全ての群で 100% 陽性であったが、総排泄腔スワブからは NDV を同時接種した群で 100% であったのに対し、HAPIV のみ接種および 3 日前に NDV を接種した群ではそれぞれ 80% および 71% の陽性率であった (図 15)。(令和元年度)

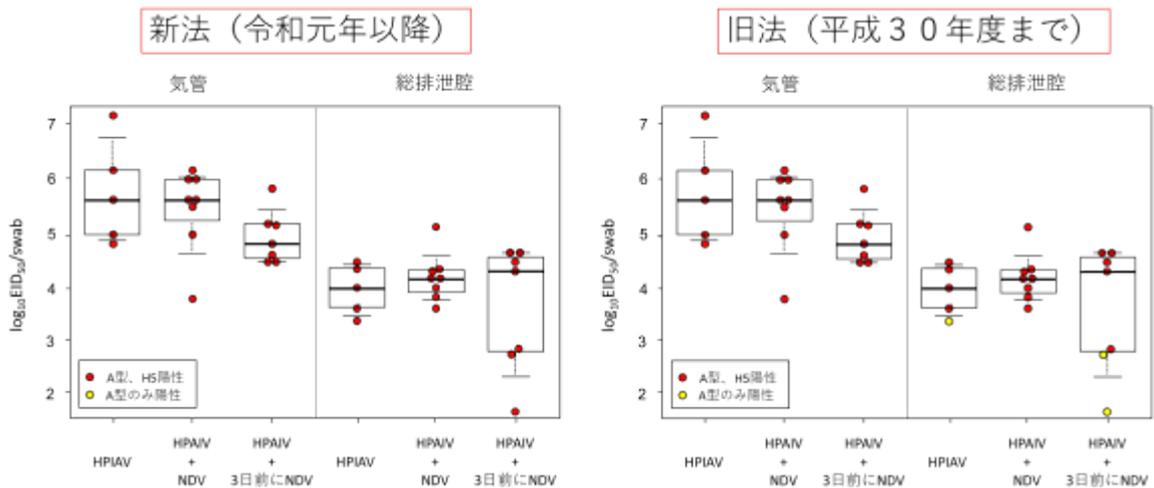


図 15. NDV と HPAIV 複合感染死亡鶏からのリアルタイム PCR 検査 (左：新法、右：旧法)

【追】当初計画に無かったが、第一回推進会議において、複合感染の動物実験の前に *in vitro* での実験を実施することとなったため、大腸菌 D2870 株および HPAI 検査の材料に混入する可能性のある呼吸器疾患に対する生ワクチンである NDV、鶏伝染性気管支炎ウイルス、鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスおよび鶏ニューモウイルスワクチンについて、2 倍階段希釈した HPAIV と混和した検体の HPAI 検査を行い、検出可能な HPAIV の力価を比較することにより、検査材料への微生物混入時の検査感度への影響を検証した。

鳥インフルエンザ簡易診断キットを用いた場合、大腸菌および生ワクチンの混入にかかわらず全て HPAI ウイルスの力価が $10^{6.3}$ EID₅₀/mL の検体で陽性を示した(表 4)。(平成 30 年度、令和元年度)

コンベンショナル PCR (旧法) の HPAIV 検出可能力価は、HPAIV 単独の検体で H5 遺伝子を検出する系が $10^{4.2}$ EID₅₀/mL、A 型を検出する系が $10^{3.9}$ EID₅₀/mL であるのに対し、大腸菌および生ワクチンが混入した検体ではそれぞれ $10^{3.6}$ から $10^{4.5}$ EID₅₀/mL、 $10^{2.4}$ から $10^{3.9}$ EID₅₀/mL であった(表 4)。H5 遺伝子を検出する系において、PBS と比べ大腸菌および伝染性気管支炎ウイルス混入時の検出限界が上がっているが、2 倍以下であった。(平成 30 年度、令和元年度)

リアルタイム PCR (旧法) の HPAIV 検出可能力価は、HPAIV 単独の検体で H5 遺伝子を検出する系が $10^{6.0}$ EID₅₀/mL、A 型を検出する系が $10^{5.4}$ EID₅₀/mL であるのに対し、大腸菌および生ワクチンが混入した検体ではそれぞれ $10^{5.7}$ から $10^{6.3}$ EID₅₀/mL、 $10^{4.8}$ から $10^{5.7}$ EID₅₀/mL であった(表 4)。H5 遺伝子を検出する系において、PBS と比べ大腸菌混入時の、A 型を検出する系において、大腸菌および伝染性気管支炎ウイルス混入時の検出限界が上がっているが、2 倍以下であった。(平成 30 年度、令和元年度)

表 4. 微生物混入による HPAIV の検査感度

微生物	混合量	検出可能力価 (log ₁₀ EID ₅₀ /mL)				
		簡易診断キット	コンベンショナルPCR		リアルタイムPCR	
			H5	A型	H5	A型
大腸菌	10 ⁶ CFU	6.3	4.5	3.9	6.3	5.7
NDV	10 ⁶ EID ₅₀	6.3	4.2	3.9	6.0	5.4
鶏伝染性気管支炎ウイルス	>10 ^{6.5} EID ₅₀	6.3	4.2	3.3	6.0	4.8
伝染性喉頭気管炎ウイルス	>10 ^{6.7} EID ₅₀	6.3	4.5	3.0	6.0	5.7
伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス	>10 ⁵ EID ₅₀	6.3	3.6	2.4	5.7	4.8
鳥ニューモウイルス	>10 ^{5.6} TCID ₅₀	6.3	4.5	3.3	6.0	5.1
PBS		6.3	4.2	3.9	6.0	5.4

【工程表②】

中課題1の工程表②で構築した大腸菌感染モデルを元に、大腸菌 D2870 株を5週齢の鶏の気嚢内に接種し、大腸菌接種と同時、1日後および3日後に HPAIV を鼻腔内接種した。HPAIV 単独接種群は6日以内に、大腸菌との複合感染群は4日以内に全て死亡した(図16)。

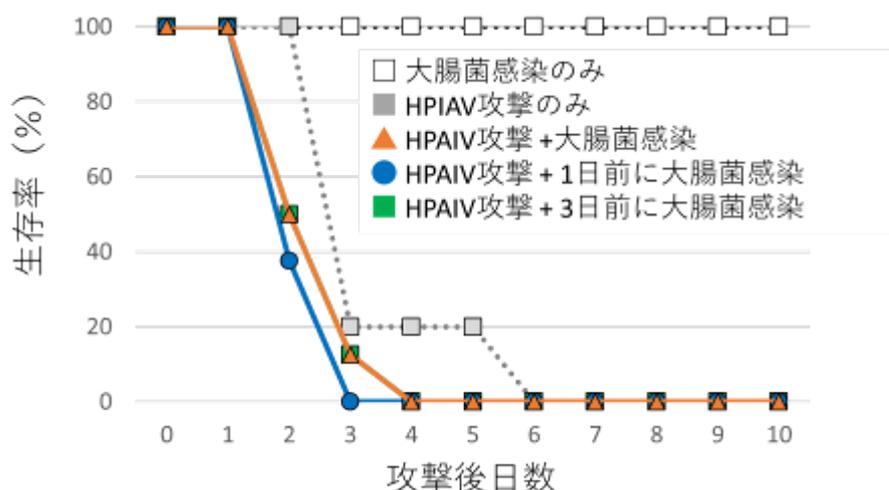


図16. 大腸菌と HPAIV 攻撃後の生存曲線

【工程表③】

工程表②で死亡した鶏の気管および総排泄腔からは、1本のスワブ当たりそれぞれ $10^{3.8}$ から $10^{6.9}$ EID₅₀ および $10^{1.6}$ から $10^{5.2}$ EID₅₀ の HPAIV が検出され、大腸菌の感染によるスワブ中の HPAIV に有意な差は認められなかった(図17)。死亡した鶏の気管および総排泄腔スワブを用いた簡易検査では HPAIV 単独接種群において、1羽の総排泄腔スワブで陰性であったのを除き、全ての鶏で陽性を示した。各接種群間において、簡易検査の判定および簡易検査の発色の強度に有意な差は認められなかった(図17)。(平成30年度、令和元年度)

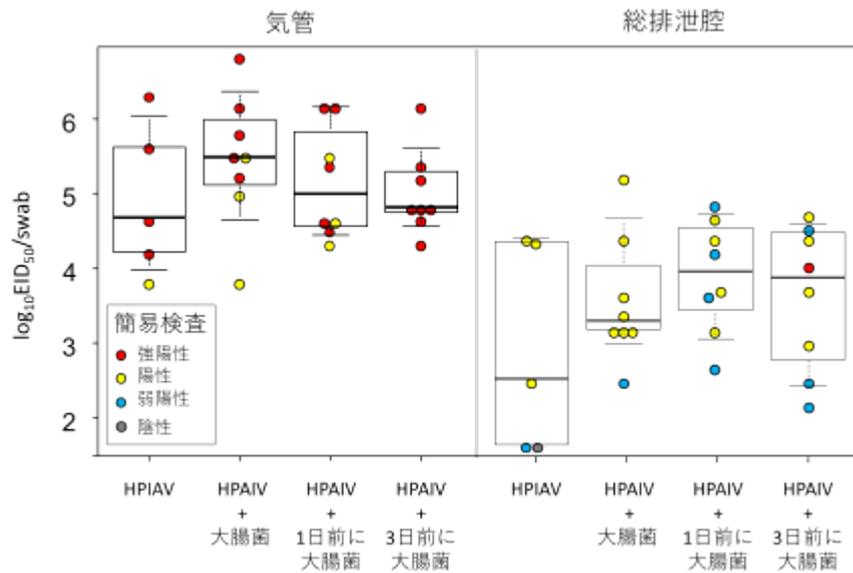


図 17. 大腸菌と HPAIV 複合感染死亡鶏からのウイルス排泄および簡易検査

死亡した鶏のリアルタイム PCR において、令和元年度に改訂された新法を用いた場合、気管、総排泄腔スワブともに全ての鶏が A 型および H5 陽性であった。平成 30 年度までの旧法では、気管スワブからは全ての検体が A 型陽性であった。一方、H5 遺伝子の検出は、HPAIV 単独接種群では 100%であったが、大腸菌を接種した鶏では、88%であった。総排泄腔スワブからの検査の陽性率は、気管スワブよりも低く、A 型は 20 から 38%が陽性であり、H5 は 3 日前に大腸菌を接種した群で 1 羽のみ陽性であった。(図 18)。(令和元年度)

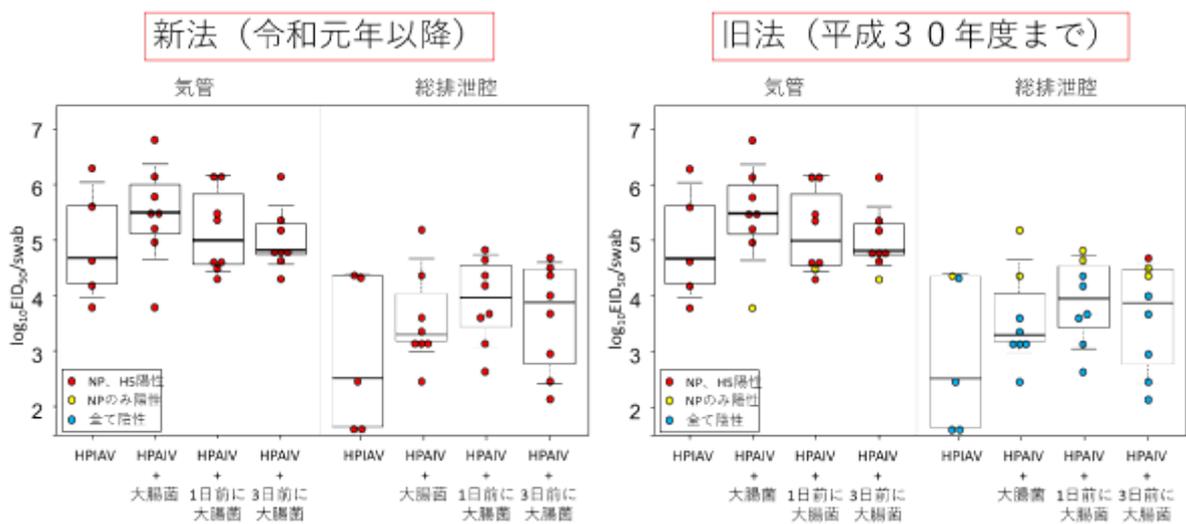


図 18. 大腸菌と HPAIV 複合感染死亡鶏からのリアルタイム PCR 検査(左：新法、右：旧法)

死亡した鶏のコンベンショナル PCR において、令和元年度に改訂された新法を用いた場合、気管、総排泄腔スワブともに全ての鶏が A 型および H5 陽性であった。平成 30 年度までの旧法では、HPAIV 単独接種群の総排泄腔スワブで 5 羽中 2 羽が陰性であったのを除き、全ての群で気管および総排泄腔スワブからが検出された。H5 遺伝子の検出は、気管スワブからは HPAIV 単独接種群および大腸菌を同時接種した鶏の群で 100%、1 日前に大腸菌を接種した群で 75% 検出された。一方、総排泄腔スワブからは、3 日前に大腸菌を接種した群で 100% 検出されたのに対し、それ以外の群では 0% から 38% の検出であった (図 19)。(令和元年度)

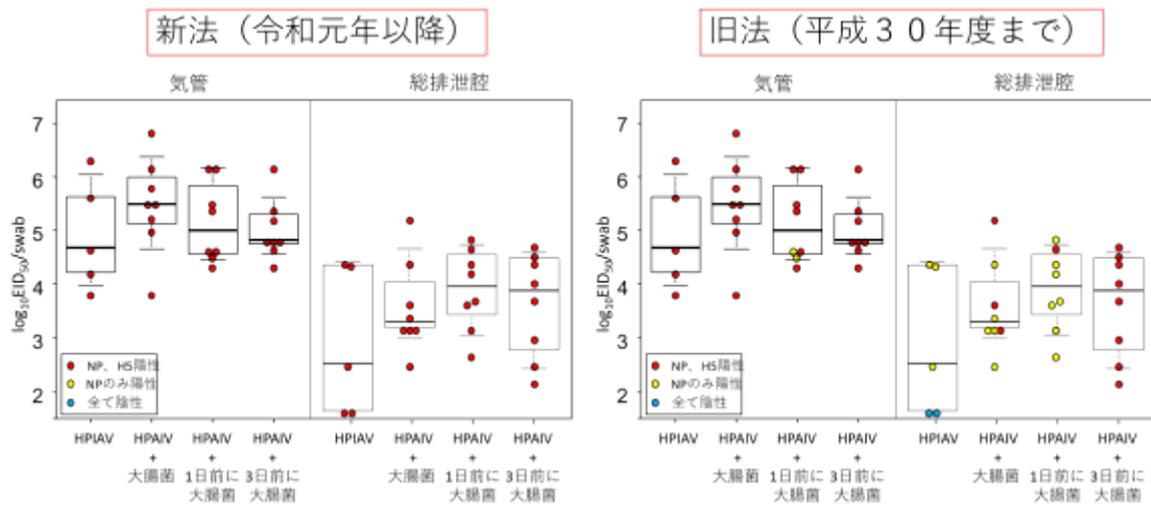


図 19. 大腸菌と HPAIV 複合感染死亡鶏からのリアルタイム PCR 検査(左:新法、右:旧法)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

大腸菌や生ワクチン等の微生物が HPAIV の検査材料に混入した場合でも、感度の低下は 2 倍以下であり、ほとんど HPAI 診断の感度を低下させないことが示された。

NDV および大腸菌が HPAIV と複合感染した場合の死亡鶏からの HPAI の遺伝子検査法については、令和元年度より変更となったため新法について追加で実施した。旧法では特に多くの総排泄腔スワブ検体において、リアルタイム PCR およびコンベンショナル PCR で陰性の判定であったが、新法では旧法でウイルスの検出が不可能であった検体からも、鳥インフルエンザの検出が可能であった。このことから、令和元年度より変更となった遺伝子検査法においては、大腸菌の複合感染や ND 生ワクチンの残留に関わらず、HPAI 診断が可能であることが確認された。簡易検査の判定においては、NDV が HPAIV と鶏に複合感染した場合、NDV 感染の時期によって総排泄腔スワブを用いた判定に影響を与える可能性が示された。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（3）～（8）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

中課題1では、鶏大腸菌症に由来する菌株を収集し、感染実験により鶏大腸菌症の実験モデルを構築したことにより目標はほぼ達成された。しかし、供試する鶏の系統やロットにより接種後の大腸菌症の発症に差異が生じる可能性がある。また、大腸菌に感染後、スワブ中への接種菌の混入は確認されたが、含まれる接種菌の数を正確に計測するためには接種菌以外との識別が可能なマーカーを組み込んだ組換え大腸菌等を使用して検証する必要がある。本課題で使用した鶏種は、採卵用に飼育される白色レグホン種であるが、国内では肉養鶏の白色コーニッシュ種や同じ採卵鶏でもロードアイランドレッド種等が飼育されている。そのため、これらの鶏種に応じたモデルを構築するためには、鶏種による感受性を調べるとともに、接種菌数が予後に与える影響等を検討する必要がある。

中課題2では、NDV および大腸菌との複合感染に関わらず、現行の HPAI 検査により死亡鶏からの診断が可能であることを確認した。また、検査材料に大腸菌および農場で使用されている呼吸器ウイルス感染症の生ワクチンが混入した場合でも、HPAI 検査にほとんど影響がないことを示したことにより、目標はほぼ達成された。また、HPAIV のウイルス株、複合感染する病原体の種類、鶏の週齢および複合感染の時機等の様々な要因が HPAI 検査に影響する可能性があるため、複合感染の影響の検証は継続的に実施する必要がある。

中課題1の結果から剖検において典型的な大腸菌症の所見がみられるのは、大腸菌感染から10日程度経てからであることが明らかとなった。本課題では、大腸菌感染初期の大腸菌症発症鶏に HPAIV が感染した場合について検証しているが、死亡時に剖検で大腸菌症と診断されるような感染中期または後期に HPAIV が感染した場合については検証していないため、今後は大腸菌の感染時期による検証が望まれる。ただし、中課題1の結果から、剖検において大腸菌症の診断がされる時期には、臨床症状はなく、大腸菌の分離もできなかったことから、この時期に HPAIV に感染したとしても検査に影響がある可能性はほとんどないと考えられる。平成30年の香川の事例のように HPAIV で死亡した鶏に剖検で大腸菌症の所見がみられた場合、大腸菌症と診断されることにより HPAI の診断が遅れる可能性がある。本課題の結果から、令和元年度より変更となった新しい HPAI 診断では、検出率が改善されていることが示されたことから、大腸菌症の所見がみられた場合でも、防疫指針に従って適切に検査を行うことにより、HPAI の診断がされることが期待される。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	鳥インフルエンザにおける大腸菌等複合感染の影響の検証
---------	----------------------------

課題番号	(1) 研究推進会議等開催回数	(2) 行政が活用しうる成果の有無	(3) 学術論文数		(4) 口頭発表回数		(5) 出版図書数	(6) 国内特許権等数		(7) 国際特許権等数		(8) 報道件数	(9) 物品購入の有無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
3007	3	無	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	無

(1) 研究推進会議等の開催実績

区分: ①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者数	消費・安全局担当官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業(追加公募)平成30年度研究推進会議(設計会議)	平成30年9月25日	農林水産省	9	有	評価委員より下記の提案がなされた。 ①感染実験において、HPAIV接種量の異なる群の追加 ②微生物とHPAIVが混在時のin vitro試験の追加 ③感染実験に使用する鶏種の追加 ④複合感染に用いる微生物の追加 このうち、①、③、④については、実施するための予算が不足しているため実施することができないが、②については、追加で実施することが決定した。
①	安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業(追加公募)平成30年度第2回研究推進会議	平成31年2月13日	農林水産省	8	有	平成30年度の成果報告および平成31年度の課題実施計画について議論した。
①	安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業(追加公募)令和元年度第1回研究推進会議	令和2年2月27日	農林水産省	8	有	平成30年度および令和元年度の成果について報告し、成果の活用および本課題の成果を用いた今後の研究に対する課題について議論した。

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
複合感染の基礎となる鶏大腸菌症に係る実験モデルの構築、尾崎 弘一、第 162 回日本獣医学会学術総会、2019年9月	鳥取大学

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		